



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Caracterización funcional e inmunológica de una  
fosfolipasa A<sub>2</sub> básica miotóxica del veneno de la  
serpiente peruana *Bothrops atrox***

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo**

**AUTOR**

**Alex Daniel PROLEÓN TORRES**

**ASESOR**

**Dra. Fanny Elizabeth LAZO MANRIQUE**

**Lima, Perú**

**2020**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Proleón, A. (2020). *Caracterización funcional e inmunológica de una fosfolipasa A2 básica miotóxica del veneno de la serpiente peruana Bothrops atrox*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	<b>0000-0001-7883-3916</b>
DNI o pasaporte del autor	75409083
Código ORCID del asesor	<b>0000-0003-2634-1631</b>
DNI o pasaporte del asesor	<b>07186191</b>
Grupo de investigación	<b>TOXIVEN (GRUPO DE INVESTIGACION EN TOXINAS DE ORIGEN ANIMAL Y SUS ANTIVENENOS)</b>
Agencia financiadora	Perú <b>-FONDECYT Contrato N° 168-FONDECYT-2017 - Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM Códigos: B17101271 y B18100081</b>
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<b>Lima-Perú Universidad Nacional Mayor de San Marcos (12.0560° S, 77.0844° W)</b>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	<b>(2019-2020)</b>
Disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.04">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.04</a>



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE**  
**BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO**  
**(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 11:02 horas del 01 de diciembre de 2020, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace ...<https://meet.google.com/ksn-umvq-pjo>,..... el jurado formado por los profesores que suscriben, dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **ALEX DANIEL PROLEÓN TORRES**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200028930, el titulando expuso su tesis: **“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL E INMUNOLÓGICA DE UNA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> BÁSICA MIOTÓXICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox*”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota .20..., calificativo: ...Aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **ALEX DANIEL PROLEÓN TORRES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las ..12:45..... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 01 de diciembre de 2020.

---

Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA  
(PRESIDENTE)

---

Dra. FANNY LAZO MANRIQUE  
(ASESORA)



**UNMSM**

Firmado digitalmente por ARBAIZA  
PRADO Lourdes Elena FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 01.12.2020 12:40:46 -05:00

---

Blga. ELENA ARBAIZA PRADO  
(MIEMBRO)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jorge Zeballos Alva', on a light blue background.

---

Blgo. JORGE ZEBALLOS ALVA  
(MIEMBRO)

**La presente fue desarrollada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, gracias al apoyo financiero proporcionado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) mediante el Contrato N° 168-FONDECYT-2017 y el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM (Códigos: B17101271 y B18100081).**

## DEDICATORIA

*A mis padres, Celso y María, los cuales tienen y tendrán mi gratitud eterna por el cariño y amor que siempre me tuvieron, por todos los valores enseñados y por la plena confianza que siempre me tuvieron. A ellos, les dedico este pequeño fruto de mi dedicación y esfuerzo.*

*A mis hermanos, Julissa y Alonso, por todo el aprecio y respeto que siempre mostraron y por estar siempre dispuestos a brindarme su ayuda cuando sea necesario.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Yarleque, jefe del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por toda la confianza otorgada desde mi ingreso al laboratorio, por todas las facilidades que me dio desde mi llegada hasta la realización de este trabajo, y por todos los consejos, enseñanzas y todo tipo de apoyo brindado a lo largo de estos años.

Al Dr. Dan Vivas, por los múltiples consejos brindados a lo largo de estos años, tanto en el ámbito académico como en el ámbito personal, los cuales permitieron que mejorara varios aspectos de mi persona y así ayudarme a crecer como investigador. De igual manera, por las múltiples recomendaciones y correcciones aplicadas en el desarrollo de este trabajo, así como por el impulso que siempre genera para el desarrollo de proyectos.

Al Mg. Gustavo Sandoval, por las críticas constructivas y consejos en el desarrollo de este trabajo, así como por sus múltiples enseñanzas otorgadas en los cursos de la carrera, las cuales resultaron ser bastante valiosas para mi formación académica en general.

A la Dr. Fanny Lazo, por el asesoramiento de este trabajo, las múltiples correcciones realizadas y las sugerencias brindadas, además de las experiencias compartidas durante mi estadía en el laboratorio. A la Mg. Edith Rodríguez, por los consejos y las enseñanzas brindadas, los cuales permitieron mejorar mi forma de trabajo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Daniel Torrejón, Lorgio Bautista, Andrés Agurto, Jordano Espinoza, Jorge Electo, Carmen Cayo y Jorge Mantilla, por brindarme su ayuda desinteresada en diversos puntos en la realización de este trabajo, tanto en

los trabajos de laboratorio desarrollado como en el serpentario, siendo muy importantes en los procesos de estandarización de las metodologías que fueron utilizadas. Además, por todas las experiencias amenas compartidas en estos últimos años.

Un agradecimiento especial también al Mg. Alberto López y a la profesora María Siles, miembros del Laboratorio de Genética General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por la confianza brindada durante mi estadía en aquel laboratorio, lo cual me permitió dar mis primeros pasos en el campo de investigación. También a Yajahaira Nevenka, Henry Bonilla y Shary Ríos, quienes siempre me prestaron su apoyo durante mi estadía, ayudándome en mi formación básica de laboratorio. A mis compañeros y amigos: Marlon García, Santiago Álvarez y Susan Echavarría, con quienes compartí mis primeros trabajos de investigación en aquel laboratorio, siendo estas primeras experiencias las que me ayudaron a mejorar en el futuro.

Por último, un agradecimiento especial a muchos de los profesores que tuve a lo largo de la carrera, por sus enseñanzas y su influencia en mi formación académica general. Así también, a muchos de mis compañeros y amigos de la Base 14, con quienes compartí las mejores experiencias en mi carrera universitaria.

## ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	6
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	9
1. OBJETIVO GENERAL .....	9
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....	9
HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ) .....	9
HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ) .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
1. Material biológico .....	10
2. Reactivos .....	12
3. Equipos .....	14
4. Cuantificación de proteínas .....	15
5. Purificación de la miotoxina .....	15
6. Actividad miotóxica .....	15
7. Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular de la miotoxina .....	16
8. Actividad enzimática .....	17
9. Actividad edemática .....	18
10. Actividad anticoagulante .....	18
11. Protocolo de inmunización .....	19
12. Cálculo del título de anticuerpos contra la miotoxina y otros venenos de serpientes peruanas mediante la técnica de ELISA .....	20
13. Análisis de la especificidad de los anticuerpos por Western Blot .....	21

14. Neutralización de la miotoxidad.....	21
15. Análisis estadístico.....	22
RESULTADOS .....	23
1. Purificación de la miotoxina.....	23
2. Pureza y peso molecular de la miotoxina .....	26
3. Actividad miotóxica.....	27
4. Actividad de fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	28
5. Actividad edemática .....	29
6. Actividad anticoagulante .....	30
7. Detección y título de anticuerpos contra la miotoxina de <i>B. atrox</i> .....	30
8. Neutralización de los anticuerpos anti-miotoxina.....	32
9. Análisis de la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-miotoxina.....	33
DISCUSIÓN .....	37
1. Purificación de la proteína.....	37
2. Determinación del peso molecular.....	38
3. Actividad enzimática de la miotoxina .....	40
4. Actividad miotóxica.....	42
5. Actividad edemática .....	45
6. Actividad anticoagulante .....	46
7. Inmunogenicidad y neutralización .....	47
8. Reactividad cruzada.....	50
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## ABREVIATURAS

CM-Sephadex C-25	:	Carboximetil Sephadex C-25
PAGE	:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS	:	Sodio dodecil sulfato
Tris	:	Tris (hidroximetil) amino metano
mg y µg	:	miligramo y microgramo
kDa	:	kilodalton
U	:	Unidades de actividad
M	:	Molaridad
ELISA	:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HCl	:	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Peróxido de hidrógeno
pH	:	Potencial de hidrógeno
pI	:	Punto isoeléctrico
rpm	:	Revoluciones por minuto
TEMED	:	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamino
DAB	:	3,3-Diaminobenzidina
PBS	:	Buffer fosfato salino
OPD	:	<i>o</i> -Fenilendiamina dihidrocloruro
mL, µL	:	mililitro y microlitro
DMM	:	Dosis mitotóxica mínima
PLA <sub>2</sub>	:	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
NaCl	:	Cloruro de sodio
DEM	:	Dosis edemática mínima
IU/L	:	Unidades internacionales por litro
CK	:	Creatina Kinasa

## RESUMEN

La serpiente *Bothrops atrox*, la mayor responsable de los accidentes ofídicos en el Perú, desencadena una fisiopatología por envenenamiento que se ve caracterizada en gran parte por la miotoxicidad. Por ello, en la presente tesis se ha aislado al componente responsable de la miotoxicidad del veneno de *B. atrox* para estudiar sus principales características biológicas e inmunológicas. La proteína fue purificada en un paso cromatográfico, empleando una resina CM-Sephadex C-25, mediante un gradiente de NaCl 0.6 M. El análisis por SDS-PAGE, mostró una sola banda de aproximadamente 13 kDa bajo condiciones reductoras, mientras que una banda ancha de 24 kDa fue observada bajo condiciones no reductoras. La proteína aislada mostró actividad enzimática de fosfolipasa A<sub>2</sub>, tanto para retardo de coagulación de yema de huevo como para el ensayo espectrofotométrico de fosfatidilcolina. En cuanto a su dosis miotóxica mínima, esta fue  $12.30 \pm 0.95$  µg, mientras que para el veneno total, el valor fue  $23.50 \pm 1.09$  µg. La dosis edemática mínima fue de  $26.00 \pm 1.15$  µg. Además, la enzima presentó actividad anticoagulante. Por otro lado, se logró obtener un suero anti-miotoxina de *B. atrox*, producido en conejos, con un título de 16 000. Al realizar los ensayos de neutralización del suero anti-miotoxina, un suero anti-B.atrox y el suero antibotrópico del INS, se obtuvieron como dosis efectiva media 0.34 mL de suero/mg de miotoxina, 0.93 mL de suero/mg de miotoxina y 0.1 mL de suero/mg de miotoxina, respectivamente. Finalmente, los anticuerpos anti-miotoxina reaccionaron de forma cruzada con los venenos de *B. atrox* (1:8000), *Bothrops brazili* (1:10 000), *Bothrops pictus* (1:4000) *Lachesis muta* (1:2000) y *Crotalus durissus* (1:1000). De esta forma, se logró purificar y caracterizar funcionalmente una fosfolipasa miotóxica del veneno de *B. atrox*, así como obtener anticuerpos a partir de esta para obtener más información acerca de su inmunogenicidad.

**Palabras claves:** *Bothrops atrox*, fosfolipasa A<sub>2</sub>, miotoxina, veneno, anticuerpos.

## ABSTRACT

The snake *Bothrops atrox*, the responsible of most of the ophidic accidents in Peru, triggers a pathophysiology by envenoming that is characterized in great measure due to myotoxicity. Thus, in the present thesis was isolated a responsible component of the myotoxicity by *B. atrox* snakebite envenoming, in order to study its main biological and immunological characteristics. The protein was purified in a chromatographic step, using a resin CM-Sephadex C-25, through a gradient of NaCl at 0.6 M. The SDS-PAGE analysis showed a single band of approximately 13 kDa under reducing conditions, whereas a broad band at 24 kDa was observed under non-reducing conditions. The isolated protein had enzymatic activity of phospholipase A<sub>2</sub>, both for egg yolk coagulation delay and for the phosphatidylcholine spectrophotometric assay. Regarding its minimum myotoxic dose, this was  $12.30 \pm 0.95$  µg, while for crude venom, the value was  $23.50 \pm 1.09$  µg. The minimum edema dose was  $26.00 \pm 1.15$  µg. Further, the myotoxin had anticoagulant activity. On the other hand, was obtained a serum anti-myotoxin of *B. atrox*, produced in rabbits, with a title of 16000. In the neutralization tests of the anti-myotoxin serum, an anti-B.atrox serum and the INS antitropic serum, the mean effective doses were 0.34 mL of serum/mg of myotoxin, 0.93 mL of serum/mg of myotoxin and 0.1 mL serum/mg of myotoxin, respectively. Finally, the anti-myotoxin antibodies cross reacted with the venoms of *B. atrox* (1:8000), *Bothrops brazili* (1:10 000), *Bothrops pictus* (1:4000), *Lachesis muta* (1:2000) y *Crotalus durissus* (1:1000). Thus, it was achieved to purify and characterize functionally a myotoxic phospholipase of *B. atrox* venom, as well as get antibodies from this to obtain more information about of its immunogenicity.

**Keywords:** *Bothrops atrox*, phospholipase A<sub>2</sub>, myotoxin, venom, antibodies.

## INTRODUCCIÓN

Los envenenamientos por mordeduras de serpiente (ofidismo) son un problema de salud pública de gran complejidad que afecta a las comunidades rurales de países tropicales en Asia, África y América Latina (Gutiérrez et al., 2010). Al igual que el dengue y la enfermedad de Chagas, el ofidismo es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida, debido a que su riesgo está siempre presente en zonas rurales de recursos médicos escasos (Chippaux, 2017). A nivel mundial, cada año se reportan entre 1.8 a 2.7 millones de casos de ofidismo, los cuales causan entre 81000 a 138000 muertes, y aproximadamente, el triple de amputaciones y otras discapacidades permanentes. Entre los efectos del ofidismo se pueden encontrar la parálisis grave de los músculos respiratorios, trastornos hemorrágicos, insuficiencia renal irreversible o una grave destrucción local de tejidos que puede ocasionar discapacidades permanentes y, en algunos casos, la amputación de un miembro e incluso la muerte del paciente (Gutiérrez et al., 2017).

El Perú es un país con una gran variedad de serpientes venenosas (33 especies formalmente reportadas) (MINSA - Centro Nacional de Epidemiología y Control de Enfermedades, 2017), siendo a su vez uno de los países donde el ofidismo representa un problema relevante de salud pública (Zavaleta, 2004). La serpiente *Bothrops atrox*, conocida como “Jergón”, es la principal especie causante de la mayoría de envenenamientos ofídicos reportados (87.6 %), principalmente en las zonas bajas al este de los Andes y en las selvas tropicales del país (Zavaleta, 2004). Como la mayoría de las serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, el envenenamiento por mordedura de *B. atrox* (Bothropismo) está caracterizado por generar un cuadro clínico complejo que incluye daños de carácter local (hemorragia, edema, inflamación, necrosis y degradación de la matriz extracelular) así como alteraciones de carácter sistémico (Warrell, 2010). Basado en las propiedades biológicas del veneno de las



especies de serpientes del género *Bothrops*, incluyendo *B. atrox*, y estudios de carácter proteómico de estos mismos (Kohlhoff et al., 2012), se ha podido develar el número de familias de toxinas que los componen. Entre las principales se encuentran las metaloproteasas del tipo I, II y III (SVMPs: Snake venom metalloproteinases), serinoproteasas (SVSPs: Snake venom serinoproteinases), L-aminoácido oxidasas (L-AAOs) y fosfolipasas tipo 2 (PLA<sub>2</sub>s), perteneciendo todas ellas a los grupos de proteínas más abundantes y tóxicas que están correlacionadas con las características clínicas desencadenada por los envenenamientos (Sousa et al., 2013).

Entre las características clínicas que surgen como consecuencia del bothropismo, está la necrosis muscular o mionecrosis, la cual es capaz de causar una permanente pérdida de tejido y una posible amputación del miembro afectado (Nishioka y Silveira, 1992). La mionecrosis puede llegar a ser de manera indirecta por la isquemia y degeneración de vasos sanguíneos desencadenada por las metaloproteasas hemorrágicas o por el efecto directo de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, las cuales tienen como punto de acción a las membranas plasmáticas de las células musculares (Rosenfeld, 1971). Dado su rol directo en la miotoxicidad, las PLA<sub>2</sub>s han sido tomadas en cuenta en múltiples estudios de caracterización en los últimos años.

Las PLA<sub>2</sub>s (EC 3.1.1.4) son enzimas que hidrolizan fosfoglicéridos en el enlace acil-éster en la posición sn-2, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos. Estas enzimas constituyen una gran superfamilia de proteínas que están ampliamente distribuida en los seres vivos. Las PLA<sub>2</sub>s encontradas en los venenos de serpiente corresponden al tipo de PLA<sub>2</sub>s secretadas (sPLA<sub>2</sub>s) (Dennis et al., 2011). Las sPLA<sub>2</sub>s, en base a sus propiedades estructurales y bioquímicas, han sido clasificadas en 15 grupos (I-XV) (Schaloske y Dennis, 2006). Las PLA<sub>2</sub>s presentes en los venenos de Elápidos pertenecen al grupo I, mientras las encontradas en venenos de Vipéridos pertenecen al grupo II. Estos grupos principalmente se diferencian por la posición de uno de sus

siete puentes disulfuro y por la presencia de una corta extensión de la región C-terminal en este último (Arni y Ward, 1996).

Virtualmente, todos los venenos de viperidos estudiados cuentan con PLA<sub>2</sub>s, cuya proporción puede llegar a alcanzar el 60% del total de proteínas en algunas especies (Calvete et al., 2007). Este grupo de PLA<sub>2</sub>s cuenta con una remarcable subdivisión, basada en cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos y su capacidad de hidrolizar fosfolípidos. El aminoácido aspartato de posición 49, conservado en las PLA<sub>2</sub>s ancestrales por ser parte fundamental del centro catalítico, fue reemplazado en algunas enzimas por el aminoácido lisina (o en menor medida, por serina, arginina, glicina o asparagina) (Lomonte y Gutiérrez, 2011). Esto, junto a otras sustituciones aminoacídicas importantes, anula el mecanismo catalítico dependiente de calcio, dando lugar a un nuevo subgrupo denominado Lys49-PLA<sub>2</sub>s, también conocidas como “proteínas tipo PLA<sub>2</sub>”, “PLA<sub>2</sub>s homólogas” o “miotoxinas Lys49” (Lomonte et al., 2009).

Todas las Lys49-PLA<sub>2</sub>s estudiadas comparten la habilidad de inducir mionecrosis en los ensayos con roedores. En adición a la miotoxicidad, este grupo de proteínas cuenta con efectos relacionados a la desestabilización de la membrana (citotoxicidad) y efectos relacionados a respuestas inflamatorias (actividad edemática y liberación de citoquinas), lo cual resalta que la pérdida de la actividad enzimática no disminuye la toxicidad de estas PLA<sub>2</sub>s (Lomonte y Rangel, 2012). Las Lys49-PLA<sub>2</sub>s son proteínas de naturaleza básica (pI 8 a 10). Su estructura primaria consiste de 120 a 122 aminoácidos, estabilizados por siete puentes disulfuro intracatenarios, provocando estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura. En cuanto a su estructura cuaternaria, muchas de estas proteínas han sido halladas como homodímeros y, también, como monómeros en estructuras cristalizadas resueltas; sin embargo, las condiciones ácidas durante los procesos de cristalización y purificación pudieron haber causado la disociación de la proteína en monómeros (De Oliveira et al., 2009).

La actividad miotóxica de las Lys49-PLA<sub>2</sub>s ha sido propuesta como resultado de la desestabilización del sarcolema (Gallacci y Calvacante, 2010). Inicialmente, esta desestabilización resulta en la pérdida del control de la permeabilidad de iones (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>+2</sup>). Específicamente, el incremento de la concentración de Ca<sup>+2</sup> en el sarcolema promueve efectos perjudiciales como hipercontracción de filamentos, daño mitocondrial y la activación de proteasas y PLA<sub>2</sub>s dependientes de calcio, que amplifican el daño muscular (Montecucco et al., 2008). Finalmente, el ATP liberado por el sarcolema dañado entra en las fibras musculares cercanas no afectadas por la toxina, activando receptores purinérgicos que resulta en una nueva despolarización celular que desencadena los efectos anteriormente mencionados generando nuevas regiones afectadas (Cintra-Franchischinelli et al., 2010). La desestabilización de membrana inicial está asociada con los residuos de la región C-terminal y es potenciada por el ensamblaje homodimérico de la proteína. Esto último es importante, porque la entrada de moléculas hidrofóbicas (ácidos grasos) en la proteína lleva al reordenamiento de los monómeros para formar una estructura que desestabiliza la membrana (Fernandes et al., 2013).

En cuanto al efecto patológico de las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, esto representa una difícil tarea médica debido a la extrema rapidez de su desarrollo. Los antivenenos, tradicionalmente tienen la capacidad de neutralizar los efectos letales de los venenos; sin embargo, la neutralización de la letalidad no necesariamente esta correlacionada con la neutralización de todas las actividades farmacológicas (WHO, 1981). No obstante, los antivenenos convencionales si cuentan con anticuerpos que son capaces de neutralizar la acción miotóxica, pero, estos anticuerpos solo reducen parcialmente el daño que sufre el tejido debido a los efectos perjudiciales que generan las miotoxinas antes de ser neutralizadas (Lomonte et al., 2009a). Además, los actuales protocolos de inmunización para elaborar antivenenos hacen que la respuesta inmune se genere frente a todas las proteínas del veneno (hiperinmunización), sin tomar en

cuenta si son toxinas relevantes o no (Howes et al., 2005), lo cual puede causar que el antiveneno disminuya en eficacia frente a las toxinas principales (PLA<sub>2</sub>s, SVMPs, SVSPs) debido a que cuenta con anticuerpos para componentes no tóxicos del veneno que no son muy relevantes (Harrison, 2004).

Por otro lado, un punto a tomar en cuenta es la similitud antigénica de las PLA<sub>2</sub> miotóxicas en especies del mismo género, específicamente *Bothrops*. En general, las proteínas de los venenos de las serpientes del género *Bothrops* comparten muchos antígenos, por lo que un antiveneno producido a partir de una especie en particular puede neutralizar los efectos letales de los venenos de una especie distinta del mismo género, propiedad denominada reactividad cruzada (Silva et al., 1989). De manera específica, las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas parecen tener similitud antigénica, debido a que la acción miotóxica de una especie de serpiente del género *Bothrops* puede ser neutralizada parcialmente por un suero producido a partir del veneno de una especie distinta del mismo género (Ferreira et al., 1992). Esto lleva a que se busque aislar la toxina para estudiarla de manera individual, ya que características como su inmunogenicidad, reactividad cruzada y neutralización por anticuerpos podrían ser evaluadas, ayudando a dilucidar las propiedades inmunológicas de las toxinas. Adicionalmente, este tipo de propiedades pueden ser analizadas a un nivel molecular, estudiando detalladamente la estructura antigénica de la toxina (Menez, 1985), lo cual conllevaría a obtener información útil para el mejoramiento de la producción racional y uso clínico de los antivenenos.

Por este motivo, el presente trabajo estuvo enfocado en caracterizar a nivel funcional e inmunológico una miotoxina aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, estableciendo además la similitud que existe a nivel antigénico con las isoformas de esta toxina encontradas en los venenos de otras serpientes peruanas.

## ANTECEDENTES

En 1969 iniciaron los estudios sobre consecuencias del envenenamiento por mordedura de la serpiente *Crotalus durissus* en roedores, apreciándose la parálisis del sistema locomotor de la presa, mucho antes que el veneno provoque la muerte (Minton, 1969). Años más tarde, la causa de este efecto fue atribuida a una pequeña proteína denominada Crotamina, aislada de *Crotalus durissus terrificus*, y caracterizándose como miotoxina (Cameron et al., 1978); sin embargo, este solo era un tipo de miotoxina que se encontraba en el veneno ofídico. Otro tipo de miotoxina, las “cardiotoxinas” fueron halladas como las responsables de la miotoxicidad producida por el envenenamiento de algunos elápidos (Chang, 1979). Mientras que un tercer grupo, las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, fueron develadas con el aislamiento de proteínas como la Crotoxina (Hawgood, 1982). Dada su mayor complejidad y mayor toxicidad, el interés en este último tipo de miotoxinas conllevó a su estudio funcional y estructural.

Ya que la mionecrosis es una consecuencia del bothropismo, el proceso de purificación de fosfolipasas miotóxicas se centró en el género *Bothrops*. Un componente miotóxico denominado “miotoxina I” fue aislado del veneno de la serpiente *Bothrops asper*. Esta proteína era monomérica y presentaba la actividad enzimática típica de las PLA<sub>2</sub>s (Gutiérrez et al., 1984); sin embargo, años más tarde, el mismo grupo de investigación aisló, a partir del veneno de *Bothrops nummifer*, una fosfolipasa miotóxica que era dimérica y carecía de actividad enzimática (Gutiérrez et al., 1986a). Señalando que no necesariamente existía una relación entre la actividad enzimática y la toxicidad de la proteína.

En el ámbito inmunológico, fue necesario evaluar la capacidad de neutralización de la miotoxicidad por los sueros antiofídicos producidos. A partir de la miotoxina I fueron aislados anticuerpos específicos de un antiveneno equino por cromatografía de afinidad (Lomonte et al., 1985), demostrando que el suero contenía anticuerpos que

reconocen esta toxina. Además, se desarrolló un protocolo de inmunización en conejos para la producción de anticuerpos policlonales (Lomonte et al., 1987). Esto último sirvió para generar ensayos de neutralización que lograban entre un 70 a 80% de reducción de la miotoxicidad, infiriendo que esta proteína no era el único factor responsable de la mionecrosis.

Los posteriores procesos de purificación demostraron que existen diferentes isoformas de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas en el veneno de serpiente. Por ejemplo, del veneno de *B. asper* se han logrado aislar hasta cinco isoformas de miotoxinas (Gutiérrez y Lomonte, 1995). Los ensayos de neutralización de anticuerpos producidos a partir de la miotoxina I mostraron que también podían neutralizar a la miotoxina II (isoforma catalíticamente inactiva) del mismo veneno, infiriendo una reactividad cruzada bastante marcada (Lomonte et al., 1990a). Además, los anticuerpos anti-miotoxina II, eran capaces de neutralizar la actividad enzimática de la miotoxina I, demostrando la conservación de epítopos relevantes en ambas proteínas.

La reactividad cruzada de los anticuerpos anti-miotoxina (I y II) del veneno de *B. asper*, fue aprovechada posteriormente para detectar proteínas antigénicamente relacionadas en otros venenos de serpientes. Mediante ensayos de Western Blot, se destacó la presencia de isoformas en los venenos de la serpiente *B. atrox* de Perú, Ecuador, Colombia y Brasil, así como en múltiples venenos de serpientes del género *Bothrops* (Lomonte et al., 1990c). Dada la especificidad de los anticuerpos monoclonales, se pudo asociar ciertas isoformas a la miotoxina I del veneno de *B. asper*. Por ejemplo, estos anticuerpos monoclonales mostraron reactividad frente al veneno de *B. atrox* de Colombia, pero no reaccionaban frente a los venenos de *B. atrox* de Perú, Ecuador y Brasil. Estos resultados fueron complementados cuando se aisló y caracterizó funcionalmente a la miotoxina del veneno de *B. atrox* de Colombia. Esta miotoxina resultó ser catalíticamente activa y monomérica, siendo bastante similar a su

contraparte del veneno de *B. asper* (Miotoxina I) (Lomonte et al., 1990b). Por otra parte, al aislar la miotoxina del veneno de *B. atrox* de Brasil (At-VI), se observó que ésta presentaba una actividad enzimática extremadamente baja, además de demostrarse que, al igual de la miotoxina II, era una Lys49-PLA<sub>2</sub> (Andrião-Escarso et al., 2000). Posteriormente, del veneno de *B. atrox* de Brasil, se logró aislar dos miotoxinas, una catalíticamente inactiva (BaPLA<sub>2</sub>I) y otra catalíticamente activa (BaPLA<sub>2</sub>III). BaPLA<sub>2</sub>I presentó una actividad enzimática extremadamente baja, un pI de 9.1 y pertenecía al grupo de Lys49-PLA<sub>2</sub>s. Por el contrario, la BaPLA<sub>2</sub>III (pI: 6.7) tuvo una actividad enzimática 130 veces mayor que BaPLA<sub>2</sub>I, y pertenecía al grupo de las Asp49-PLA<sub>2</sub>s (Kanashiro et al., 2002). Así también, fue aislada una miotoxina dimérica del veneno de *B. atrox* del Perú, con pI básico y catalíticamente activa. No obstante, no se especifica si la actividad presentada es escasa o alta. Además, que no se cuenta con la secuencia de aminoácidos de dicha enzima, desconociéndose su tipo de isoforma (Lys49-PLA<sub>2</sub> o Asp49- PLA<sub>2</sub>) (Huatuco et al., 2004).

Hasta el 2012, al menos 65 PLA<sub>2</sub>s miotóxicas de venenos de serpientes han sido aisladas y caracterizadas (Lomonte y Rangel, 2012), logrando avances importantes en su comprensión; sin embargo, el continuo estudio de estas proteínas es necesario para tener una visión más completa sobre su origen, evolución y mecanismo de acción.

## OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 1. OBJETIVO GENERAL

-Evaluar las principales características funcionales e inmunológicas de una fosfolipasa A<sub>2</sub> básica miotóxica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Purificar una fosfolipasa miotóxica a partir del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*.

-Determinar los parámetros de las principales características funcionales de una miotoxina.

-Caracterizar la miotoxina a nivel inmunológico a partir de ensayos de neutralización y pruebas de reactividad cruzada.

## FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

### HIPÓTESIS NULA (H<sub>0</sub>)

-H<sub>0</sub>: La proteína aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* peruana no presenta las características funcionales e inmunológicas de una fosfolipasa A<sub>2</sub> básica miotóxica.

### HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H<sub>1</sub>)

-H<sub>1</sub>: La proteína aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* peruana presenta las características funcionales e inmunológicas de una fosfolipasa A<sub>2</sub> básica miotóxica.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material biológico

#### 1.1. Venenos

Se utilizó un pool de veneno de especímenes adultos de *Bothrops atrox* procedentes de Pucallpa (Ucayali), los cuales fueron mantenidos en cautiverio en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la UNMSM. El veneno fue extraído por presión manual de las glándulas venenosas, siendo luego liofilizado y conservado a 4°C hasta su uso en las correspondientes pruebas experimentales.

Para evaluar la reactividad cruzada se emplearon venenos totales de las especies: *Bothrops brazili*, *Bothrops pictus*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus*, ejemplares que fueron mantenidos en el mismo serpentario y cuyos venenos, fueron extraídos mediante el mismo protocolo.



**Figura 1.** La serpiente *Bothrops atrox* ("jergón") del Perú. Fotografía tomada en Pucallpa-Ucayali. Fuente: Serpentario "Oswaldo Meneses". Museo de Historia Natural-UNMSM.

## 1.2. Animales de laboratorio

Para la obtención de anticuerpos policlonales se utilizaron conejos albinos Nueva Zelanda (2 Kg aprox.) procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), los cuales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Medicina Tropical de la UNMSM.

Para las pruebas biológicas se utilizaron ratones albinos machos (cepa Balb-C procedentes del INS) de 18 a 20 gramos de peso corporal y de 3 a 5 meses de vida. Los animales usados en este trabajo fueron mantenidos bajo condiciones estándar (12 h de ciclo de luz y oscuridad, temperatura de 20 a 22 °C, humedad entre 60 a 70%) y con el manejo apropiado, teniendo en cuenta las guías de cuidado de animales de laboratorio del INS (Fuentes et al., 2010a; 2010b).

### 1.3. Antivenenos

Para las pruebas de neutralización fue usado el suero antibotrópico polivalente producido por el INS. Este suero es obtenido por la inmunización en caballos de una mezcla de los venenos de *B. atrox*, *B. brazili*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. hyoprora*, seguida por el fraccionamiento del plasma del caballo con sulfato de amonio para purificar las IgG. Este antiveneno está estandarizado para tener la capacidad de neutralizar 2.5 mg de veneno de *B. atrox* con 1 mL.

## 2. Reactivos

### 2.1. Sustratos

- Emulsión lipoproteica de yema de huevo
- Kit de creatina kinasa (DiaSys)
- Fosfatidilcolina (Sigma)

### 2.2. Soluciones amortiguadoras

- Buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7
- Buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7, NaCl 0.3 M
- Buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7, NaCl 0.6 M
- Buffer Fosfato Salino (PBS) 0.02 M, pH 7.4
- Buffer Tris-HCl 0.01M con Cloruro de calcio 0.01M, pH 7.6
- Citrato de sodio 3.8 %

### 2.3. Reactivos para electroforesis

- Buffer del gel de resolución: Tris-HCl 1.0 M, pH 8.8
- Buffer del gel de apilamiento: Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8

- Buffer de muestra: Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.125 %, glicerol 10 %
- Buffer de corrida: Tris-HCl 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1%
- Solución stock de acrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%)
- N N N' N'-tetrametiletilendiamino (TEMED)
- Persulfato de amonio (PSA)
- Solución colorante: Azul de coomassie 0.05%, metanol 45%, ácido acético 9%
- Solución decolorante: Metanol 20%, etanol 10%, ácido acético 5%

#### 2.4. *Reactivos para la prueba de ELISA*

- Buffer de cubierta: carbonato de sodio 0.015 M, bicarbonato de sodio 0.035 M, pH 9.6.
- Buffer Fosfatos Salino (PBS) 0.15 M, pH 7.4
- Buffer de incubación: leche descremada 0.1 %, Tween-20 0.05 % en PBS pH 7.4
- Buffer de lavado: PBS pH 7.4, Tween-20 0.05 %
- Buffer de bloqueo: leche descremada 3 %, Tween-20 0.05 % en PBS pH 7.4
- Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanito
- Diclorhidrato de *o*-fenilendiamina (OPD)
- Buffer Citrato fosfato 0.05 M, pH 5: fosfato de sodio dibásico 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M
- Peróxido de hidrógeno

#### 2.5. *Soluciones para la prueba de Western Blot*

- Buffer de transferencia: Tris 0.02 M, pH 8.3, glicina 0.193 M, SDS 0.1 %, metanol 20 %

- Buffer de bloqueo: Leche descremada 5% en Tris HCl 0.02 M, pH 7.5, NaCl 0.15 M, Tween-20 0.1%
- Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa alcalina
- 3.3-Diaminobenzidina (DAB)

#### 2.6. *Reactivo marcador de peso molecular*

- Marcador de proteína preteñido (10 a 180 kDa; Thermo Scientific)

#### 2.7. *Cromatografía de Intercambio Iónico*

- Resina CM Sephadex C-25

### 3. **Equipos**

- Espectrofotómetro Genesys 5 (Spectronic Ins.)
- Lector de placas de ELISA (SINNOWA ER-500)
- Colector de fracciones (BioFrac™)
- Equipo de electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN TetraCell, 4-Gel System (Bio-Rad)
- Fuente de Poder (Bio Rad)
- Equipo de transferencia para Western Blot (Cleaver Scientific Ltd)
- Centrífuga Easy spin (Sorvall)
- Baño de María (Memmert)
- pH metro digital (HANNA)
- Balanza Analítica (Ainsworth)
- Balanza digital (Addam)

#### **4. Cuantificación de proteínas**

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm (Warburg y Christian, 1941) en un espectrofotómetro. Además, se empleó el método de Lowry *et al.* (1951) modificado en nuestro laboratorio (Loayza *et al.*, 1985), usando el mismo espectrofotómetro y usando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

#### **5. Purificación de la miotoxina**

La metodología de purificación utilizada se basó en el procedimiento realizado por Núñez *et al.* (2004). Para este fin, 200 mg de veneno liofilizado de *B. atrox* fueron disueltos en 2.5 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M a pH 7 y se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos para eliminar residuos insolubles. Posteriormente, el sobrenadante fue aplicado a una columna de CM Sephadex C-25 (1.2x20 cm), equilibrada con el mismo buffer antes mencionado. La corrida se llevó a cabo a un flujo de 10 mL/hora a temperatura ambiente, colectándose fracciones de 2 mL en un colector de fracciones. La elución de las proteínas retenidas se realizó con el mismo buffer conteniendo NaCl 0.3 M y 0.6 M, respectivamente. La cantidad de proteína fue determinada a 280 nm. Al evaluar la actividad miotóxica de las fracciones, las que presentaban mayor actividad fueron reunidas y concentradas en tubos Millipore AMICON 10K MWCO.

#### **6. Actividad miotóxica**

La actividad miotóxica fue evaluada a través de la prueba de cuantificación de Creatina Kinasa (CK) sérica, empleando el kit de diagnóstico CK-NAC de DiaSys. Se utilizaron grupos de 4 ratones albinos de 18-22 g de peso, los cuales fueron inyectados vía intramuscular en el músculo gastrocnemio de la pata derecha con 0.1 mL de proteína a una misma concentración en diferentes tiempos, usando como control negativo 0.1 mL de PBS. Dependiendo del tiempo estimado, los ratones fueron anestesiados con cloroformo e inmediatamente se colectaron 0.4 mL de sangre del

seno venoso submandibular, y se mezclaron con 40  $\mu$ L de citrato de sodio 3.8%. Luego, la mezcla fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos para separar el plasma. Posteriormente se incubaron 40  $\mu$ L de plasma citratado con 1 mL del kit CK y se registró el incremento de absorbancia a 340 nm por 6 minutos. La actividad fue expresada en IU/L, una unidad es la resultante de la fosforilación de 1  $\mu$ mol de creatina/min a 37°C (Gutiérrez et al., 1980).

Con los datos obtenidos de la experiencia anterior, se eligió el tiempo en el que se logró la máxima actividad y con ello fue determinada la Dosis Miotoxina Mínima (DMM). La DMM se obtuvo teniendo distintas concentraciones de miotoxina (25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 75  $\mu$ g, 100  $\mu$ g) como variable. Se preparó una curva dosis-respuesta por regresión lineal ( $\mu$ g de proteína como variable dependiente y actividad CK como variable independiente), empleando una escala logarítmica para la dosis de proteína y una escala milimétrica para la actividad CK. Fue estimada la dosis de miotoxina en la que la actividad CK plasmática corresponde a 4 veces la actividad de CK del plasma de los ratones inyectados con PBS, correspondiendo esta dosis a la DMM (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

## **7. Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular de la miotoxina**

La evaluación de la pureza de la proteína, así como la determinación de su peso molecular, fue realizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15%, bajo condiciones reductoras con 2 $\beta$ -mercaptoetanol 0.5 % y condiciones no reductoras (Laemmli, 1970). Para ello se empleó 5  $\mu$ g de enzima purificada, 20  $\mu$ g de veneno total de *B. atrox* y un marcador de peso molecular. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis vertical, manteniéndose a voltaje constante (100 voltios) durante 1 hora y media

aproximadamente. Luego el gel de poliacrilamida fue teñido con azul brillante de coomassie 0.05% por 20 minutos y lavado con solución decolorante hasta que se visualicen las bandas proteicas. El tamaño de las bandas fue estimado con el software Gel Analyzer 19.1 (<http://www.gelanalyzer.com>).

## **8. Actividad enzimática**

### *8.1. Método de retardo de la coagulación de la yema de huevo (Vidal y Stoppani, 1971)*

Se evaluó la actividad enzimática empleando como sustrato una emulsión de yema de huevo al 45 % en buffer Tris-HCl 10mM con  $\text{CaCl}_2$  10mM a pH 7.6, a la cual se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de miotoxina a distintas concentraciones (25  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 75  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$ ) para luego ser incubada a 37°C por 15 minutos. Seguidamente, los tubos de ensayo fueron colocados en un baño María a 100 °C, para evaluar el tiempo de retardo de la coagulación de la yema con respecto a un blanco que no contiene proteína. La actividad específica fue calculada en base al tiempo de retardo de coagulación de la emulsión lipoproteica por minuto y por miligramo de proteína. Los ensayos se hicieron por triplicado.

### *8.2. Método espectrofotométrico (Elaborado por De Oliveira y Palma (1998) y modificado por Lazo et al. (1998))*

Para esta prueba se empleó una mezcla que contenía 15  $\mu\text{M}$  de fosfatidilcolina (Sigma), 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$ , 80nM de rojo de fenol, 20  $\mu\text{M}$  de Tritón X-100 en buffer Tris-HCl 0.01 M a pH 7.9. La mezcla se preincubó a 37°C por 2 minutos y luego, una vez colocada en el espectrofotómetro, se le agregó 20  $\mu\text{L}$  de miotoxina a distintas



concentraciones (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Se evaluó el cambio de absorbancia de la mezcla a 558 nm por minuto, durante los primeros 6 minutos. La actividad enzimática se obtuvo por la lectura en el espectrofotómetro en base la absorbancia por minuto por miligramo de proteína. Los ensayos se hicieron por triplicado.

## **9. Actividad edemática**

Fue determinado por el método de Yamakawa et al. (1976). Se utilizaron grupos de 4 ratones machos, de 18 a 22 g, los cuales fueron inyectados vía subcutánea en el cojinete de la pata posterior derecha con 0.05 mL de la miotoxina a diferentes concentraciones, mientras que en la misma zona de la pata posterior izquierda se inyectó solución salina (control negativo). Después de 3 horas se sacrificó a los animales por dislocación cervical, se cortaron a la misma altura las patas posteriores y fueron pesadas individualmente, evaluando la diferencia de peso entre ambas.

La dosis edemática mínima (DEM) fue expresada en  $\mu\text{g}$  de proteína capaz de producir una diferencia de peso equivalente al 30% respecto al control negativo. Para ello se realizó una curva dosis-respuesta por regresión lineal ( $\mu\text{g}$  de proteína como variable independiente y el porcentaje de la diferencia de peso como variable dependiente), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el porcentaje de peso (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

## **10. Actividad anticoagulante**

La actividad anticoagulante fue evaluada en plasma humano citratado. Distintas cantidades de miotoxina fueron preparadas en 100  $\mu\text{L}$  de PBS, luego añadidas a 0.5 mL de plasma e incubadas a 37 °C por 10 minutos. Alícuotas de plasma incubadas solo con PBS fueron usadas como control negativo. Posteriormente, los tiempos de

coagulación fueron registrados después de agregar 0.1 mL de  $\text{CaCl}_2$  a 0.25 M, en ensayos realizados por duplicado (Gutiérrez et al., 1986b).

## **11. Protocolo de inmunización**

Para la producción de anticuerpos anti-miotoxina de *B. atrox*, se utilizaron conejos albinos Nueva Zelanda (2 kg aproximadamente) y el protocolo de inmunización estuvo basado en el método utilizado por Lomonte *et al.* (1987). Inicialmente, se realizó una sangría parcial a los conejos a través de la vena marginal de la oreja, esto con el fin de obtener un suero pre-inmune y usarlo como control. Posteriormente, 2 mg de miotoxina disuelta en 0.5 mL de PBS, fue emulsificada con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund (CFA) y administrada vía intramuscular al conejo, siendo esta la primera inmunización. Luego, cada dos semanas durante aproximadamente dos meses, se administraron dosis de refuerzo vía subcutánea, que consistían en 1 mg de miotoxina disuelto en 0.5 mL de PBS combinada con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (IFA). Diez días después de cada inmunización, se realizó una sangría parcial a través de la vena marginal de la oreja, a fin de evaluar la producción de los anticuerpos contra la proteína en estudio. El suero fue obtenido, colocando las muestras de sangre a 37 °C por 30 minutos y posteriormente centrifugándolas a 4000 RPM por 10 minutos, separando así el suero del resto de componentes sanguíneos. Al culminar el protocolo de inmunización, se realizó una sangría total por punción cardíaca. Además de este protocolo de inmunización, se replicó el protocolo elaborado por Sandoval et al., (2011), para obtener anticuerpos anti-B.atrox.

## **12. Cálculo del título de anticuerpos contra la miotoxina y otros venenos de serpientes peruanas mediante la técnica de ELISA**

Mediante la técnica de ELISA (Engvall y Perlman, 1971) se calculó el título correspondiente, mediante el método de titulación a punto final (Alzamora et al., 2002). Para ello se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos (*Flat Bottom without Lid*). Esta fue cubierta con 100  $\mu$ L/pocillo de miotoxina de *B. atrox* (1  $\mu$ g/mL) disuelto en buffer de cubierta e incubada a 4 °C, durante una noche. Luego, se realizaron tres lavados sucesivos con buffer de lavado, para posteriormente aplicar 150  $\mu$ L/pocillo de buffer de bloqueo por 1 h a 37 °C. Después de tres lavados sucesivos a la placa, se aplicaron 100  $\mu$ L/pocillo de suero de conejo obtenido durante el protocolo de inmunización, siendo diluido seriadamente con factor 2 a partir de una dilución 1/250 disuelta en buffer de bloqueo, e incubados durante 1 h a 37 °C. Las placas fueron lavadas tres veces nuevamente con buffer de lavado y se aplicaron 100  $\mu$ L/pocillo de anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanito (1/5000 diluido en buffer de bloqueo), y luego se incubaron por 1 hora a 37°C. Finalmente, se volvieron a realizar tres lavados y se adicionaron 200  $\mu$ L/pocillo de sustrato OPD (*o*-Fenilendiamina) disuelto en buffer citrato fosfato 0.05 M, pH 5, adicionado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.16%), por 30 minutos. La reacción en la placa de poliestireno es leída inmediatamente en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. El título respectivo del suero correspondió a la inversa de la dilución del mismo, lo cual produjo un 50% de la máxima absorbancia registrada.

Por otro lado, se evaluó la reactividad cruzada del suero anti-miotoxina de *B. atrox* contra los venenos de *B. pictus*, *B. brazili*, *L. muta* y *C. durissus* siguiendo para esto los mismos parámetros utilizados en la detección de anticuerpos, y expresados como porcentaje de las densidades ópticas resultantes de la reacción entre los mencionados venenos y el suero anti-miotoxina, considerando como 100% el valor de absorbancia

obtenido entre la miotoxina de *B. atrox* y su respectivo suero a una dilución equivalente al título obtenido para esta proteína.

### **13. Análisis de la especificidad de los anticuerpos por Western Blot**

Los venenos de *B. atrox*, *B. brazili*, *B. pictus*, *L. muta* y *C. durissus* (20 µg) y la miotoxina purificada (5 µg) fueron separados por SDS-PAGE al 12%. Posteriormente, las bandas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (0.2 µm de tamaño de poro) en buffer de transferencia durante 50 minutos a 100 voltios (Towbin et al., 1979). Subsecuentemente, la membrana fue cubierta con buffer de bloqueo (5% de leche descremada) durante una noche a 4 °C. Al finalizar, se procedió a lavar la membrana tres veces con buffer de lavado para que esta sea enfrentada con el suero de conejo producto de la sangría total (1/1000 diluida en buffer de bloqueo). Luego de la exposición a temperatura ambiente por una hora, las membranas fueron lavadas nuevamente con buffer de lavado para que sean expuestas a anti-IgG de conejo ligada a peroxidasa de rabanito (1/5000 diluida en buffer de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, después de tres lavados sucesivos, las bandas de la membrana fueron reveladas con DAB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3-3'-Diaminobenzidina) por 5 minutos y la reacción fue detenida con agua destilada. El tamaño de las bandas fue estimado con el software Gel Analyser 19.1 (<http://www.gelanalyzer.com>).

### **14. Neutralización de la miotoxidad**

El ensayo de neutralización de la actividad miotóxica fue llevada a cabo enfrentando 3 veces la DMM (dosis reto) y varias diluciones de suero anti-miotoxina a razones de 1000, 500, 250, 125, 62.5 µL de antiveneno por mg de miotoxina. Los volúmenes fueron completados con PBS, de tal manera que 0.1 mL de la mezcla contenían la dosis reto de miotoxina. La mezcla de suero y miotoxina fue incubada a 37°C por 30 minutos. De igual manera, se realizaron mezclas entre miotoxina con el suero

antibotrópico comercial del Instituto Nacional de Salud (INS) para realizar la comparación de la acción neutralizante. Posteriormente se aplicó la inoculación de la mezcla vía intramuscular y se procedió de la misma manera que en el primer ensayo de miotoxicidad para hallar la actividad miotóxica en cada ratón. Los controles negativos recibieron dosis de miotoxina igual a la DMM sin mezclar con el suero, mientras que el control positivo recibió solo PBS. Cada grupo tratamiento, así como los controles, constaron de 4 ratones de 18 a 20 g. Tomando como punto de referencia (100%) el valor de la actividad CK en los ratones inyectados solo con la miotoxina, se estimó la Dosis Eficaz 50 % ( $ED_{50}$ ), parámetro correspondiente a la razón  $\mu\text{L}$  de antiveneno/mg de veneno en que la actividad CK corresponde al 50% de la actividad CK plasmática de los ratones que fueron inyectados solo con miotoxina (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

## **15. Análisis estadístico**

Los resultados fueron presentados como el valor medio  $\pm$  la desviación estándar obtenida del número indicado de pruebas. La significancia estadística de las diferencias entre los grupos fue corroborada por las pruebas ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tuckey, considerando los valores de  $p < 0.05$  como significativos. Los datos fueron analizados con el programa SPSS Statistics versión 21 (Statistics, 2012).

## RESULTADOS

### 1. Purificación de la miotoxina

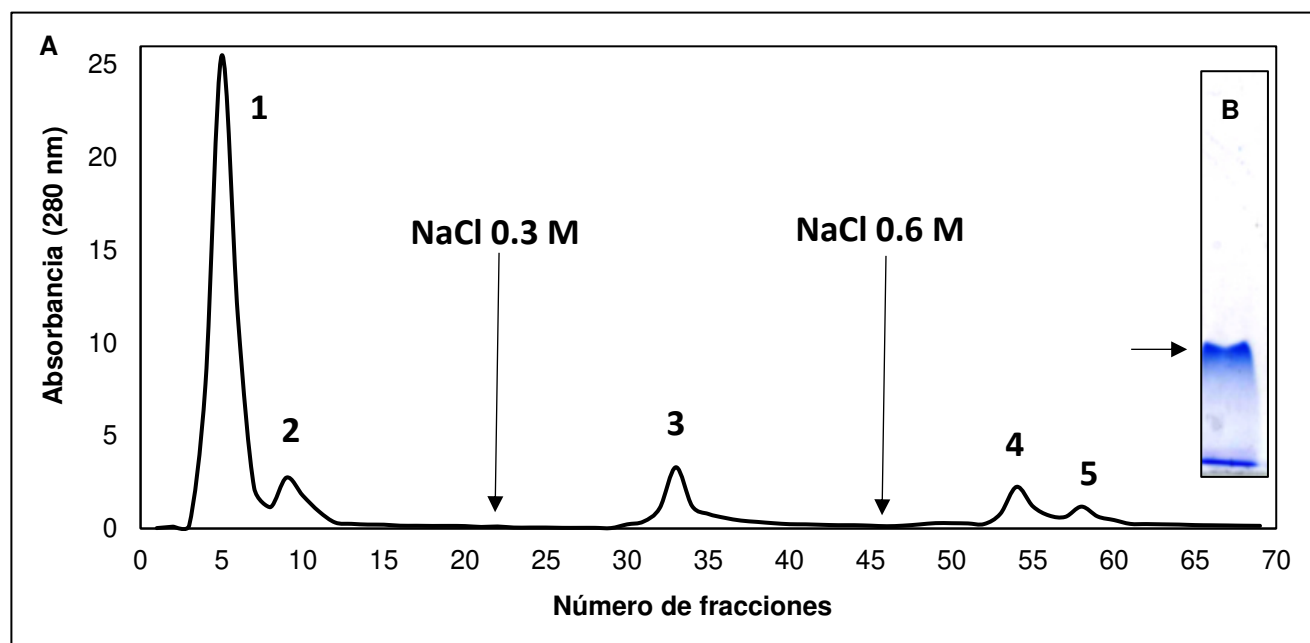
El fraccionamiento cromatográfico del veneno de *B. atrox* se realizó a través de la resina CM-Sephadex C-25 dando como resultado cinco picos (Fig. 2). Los dos primeros eluyeron directamente con el buffer. Posteriormente, al agregar NaCl 0.3 M al buffer de elución se obtuvo un tercer pico, y finalmente al agregar NaCl 0.6 M, se generó el cuarto y quinto pico. La actividad miotóxica estuvo presente en las fracciones de este último pico, por lo que estas fueron juntadas y concentradas. A partir de una SDS-PAGE se observó una sola banda (Fig. 3). Teniendo en cuenta la concentración de las fracciones que fueron juntadas en relación a la concentración de todas las fracciones eluidas, se estimó que la miotoxina representaba un 4.2% del veneno total de *B. atrox*. Por otro lado, la miotoxina eluyó luego de agregar el buffer con NaCl 0.6 M, por lo que existió una interacción de la proteína con la resina CM-Sephadex C-25. Dado que esta resina cuenta con grupos carboximetil (grupos aniónicos), la proteína debió tener una carga positiva a pH 7.0 para explicar esta interacción, por lo que se indica un comportamiento básico a este pH.

**Tabla 1.** Tabla de purificación de la miotoxina en base a la actividad enzimática.

Procedimiento	Proteína total		Actividad específica (U/mg de proteína)	Unidades totales de actividad	Rendimiento %	Purificación
	mg <sup>a</sup>	%				
Veneno total	171.57	100.00	1.830	313.97	100	1
CM-Sephadex C-25	7.2	4.2	2.575	18.54	5.90	1.41

<sup>a</sup> Proteína cuantificada por el método de Lowry.

<sup>b</sup> Una unidad de actividad (U) es definida por una unidad de absorbancia aumentada por la enzima por minuto.

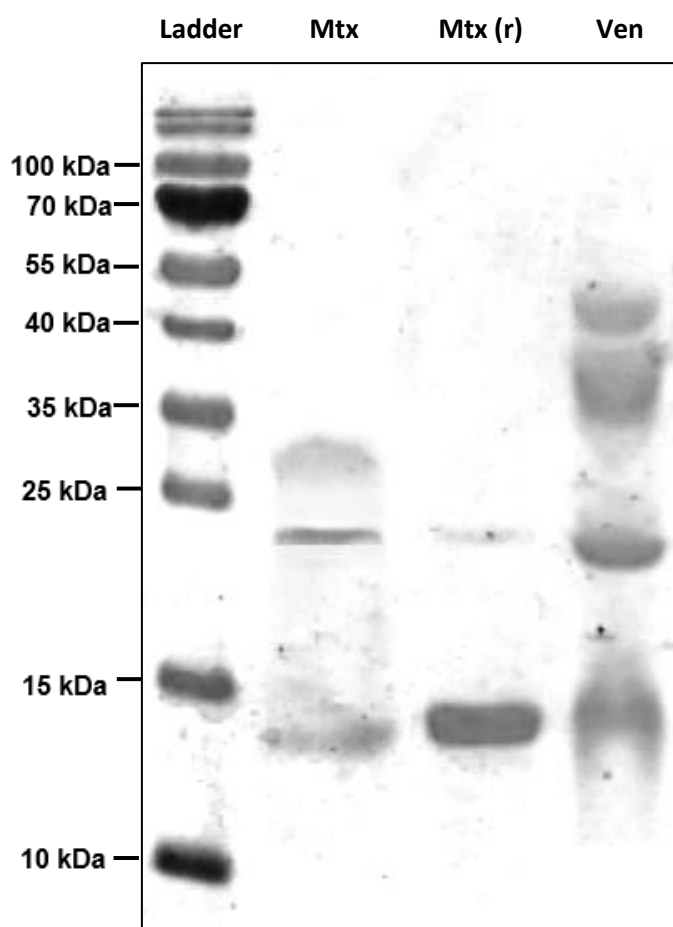


**Figura 2. (A)** Fraccionamiento del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* sobre CM-Sephadex C-25 (20cm x 1.2 cm) empleando buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7. El pico 5 contiene las fracciones que presentaron actividad miotóxica en ratones. **(B)** A la derecha, se muestran la banda proteica de la fracción miotóxica: Una banda de 25 kDa, aproximadamente.



## 2. Pureza y peso molecular de la miotoxina

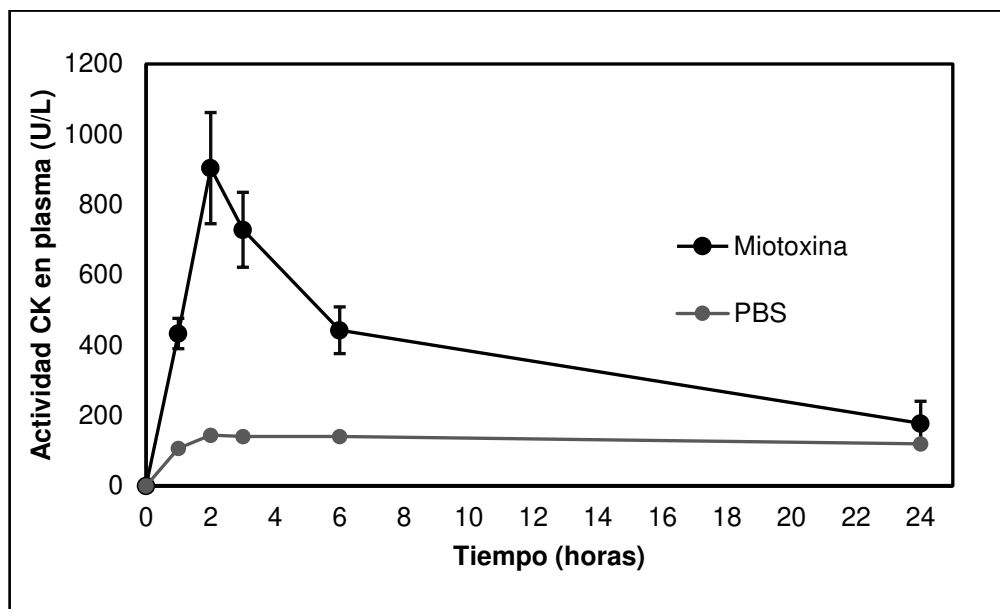
El análisis por SDS-PAGE (15 %) de la miotoxina mostró, a condiciones reductoras, una notable banda de 13 kDa y una banda muy tenue de 24 kDa. En contraste, a condiciones no reductoras, la proteína migra como una mancha que abarca desde los 13 kDa hasta los 31 kDa, entre la cual se encontraron bandas de 24 kDa y de 13 kDa (Fig. 3).



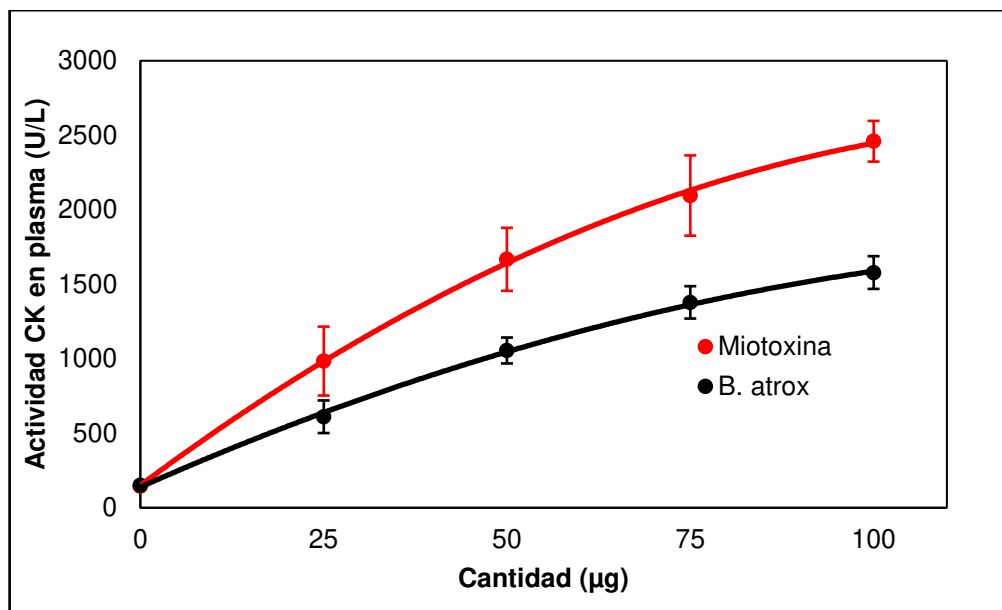
**Figura 3.** Análisis electroforético de la miotoxina aislada del veneno de *B. atrox* (SDS-PAGE 15 %). Ladder: Marcador de peso molecular. Mtx: Miotoxina en condiciones no reductoras. Mtx (r): Miotoxina en condiciones reductoras. Ven: Veneno total de *B. atrox* en condiciones no reductoras.

### 3. Actividad miotóxica

La miotoxina mostró un incremento máximo de actividad a las 2 horas, existiendo a partir de aquí un declive de actividad que fue evaluado hasta las 24 horas (Fig. 4). Este tiempo fue usado para evaluar la relación de actividad CK con diferentes cantidades de miotoxina, así como también evaluar la relación de actividad CK a distintas cantidades de veneno de *B. atrox* (Fig. 5). A partir de esto se obtuvo que la DMM de la miotoxina purificada fue de  $12.30 \pm 0.95 \mu\text{g}$  y la DMM del veneno de *B. atrox* fue de  $23.50 \pm 1.09 \mu\text{g}$ .



**Figura 4.** Actividad miotóxica de la miotoxina aislada del veneno de *B. atrox*. Actividad creatina kinasa (CK) según el tiempo después de la inoculación intramuscular de 25  $\mu\text{g}$  de miotoxina. Cada punto está representado por la desviación estándar promedio del resultado para cuatro ratones.



**Figura 5.** Actividad miotóxica de la miotoxina aislada del veneno de *B. atrox* y del veneno total de *B. atrox*. Curvas de la actividad CK en el plasma 2 horas después de inocular i.m. dosis variables de miotoxina y veneno total. Cada punto está representado por la desviación estándar promedio del resultado para cuatro ratones.

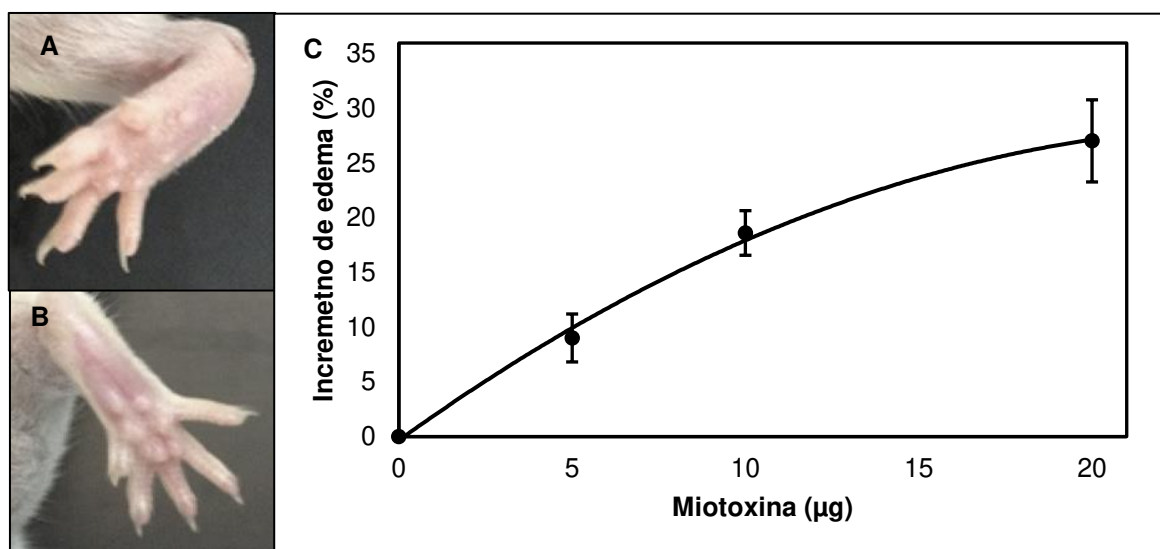
#### 4. Actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>

La miotoxina logró retardar la coagulación de la emulsión lipoproteica de la yema de huevo, evidenciando una actividad específica de  $1.25 \pm 0.17$  U/mg. Mientras que el veneno de *B. atrox* tuvo  $2.30 \pm 0.25$  U/mg de actividad específica.

Por otro lado, en el método espectrofotométrico, la miotoxina presentó una actividad específica de  $2.575 \pm 0.188$  U/mg, mientras que el veneno de *B. atrox*,  $1.830 \pm 0.128$  U/mg de actividad. Dado que este método es más sensible y específico por contar con un sustrato más homogéneo, sus datos de actividad fueron usados para diseñar la tabla de purificación (Tabla 1).

## 5. Actividad edemática

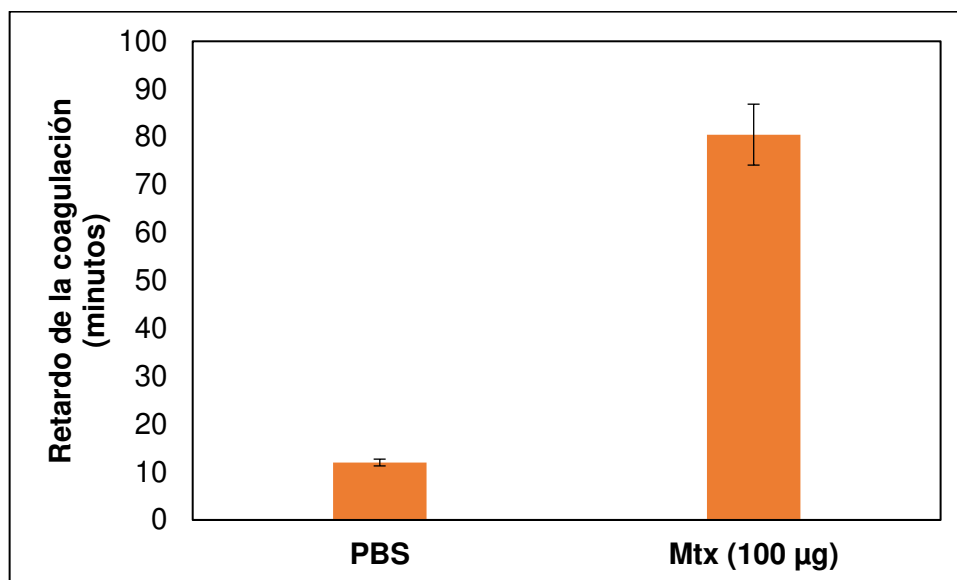
La miotoxina purificada produjo la formación de un edema en la pata inoculada (derecha), la cual fue evaluada a distintas cantidades de proteína (Fig. 6). LA DEM de la miotoxina fue de  $26.00 \pm 1.15 \mu\text{g}$ .



**Figura 6.** Inducción de edema en ratones a distintas dosis de miotoxina. Después de 3 horas, el incremento de peso en el cojinete de la pata derecha **(A)** respecto al cojinete de la pata izquierda **(B)**, fue expresada en porcentaje de edema **(C)**. La DEM ( $26.00 \pm 1.15 \mu\text{g}$ ) fue extrapolada a partir del gráfico y no es visualizada en la figura porque las dosis usadas no alcanzaron aumentos superiores al 30% de edema. Cada punto está representado por la desviación estándar promedio del resultado para cuatro ratones

## 6. Actividad anticoagulante

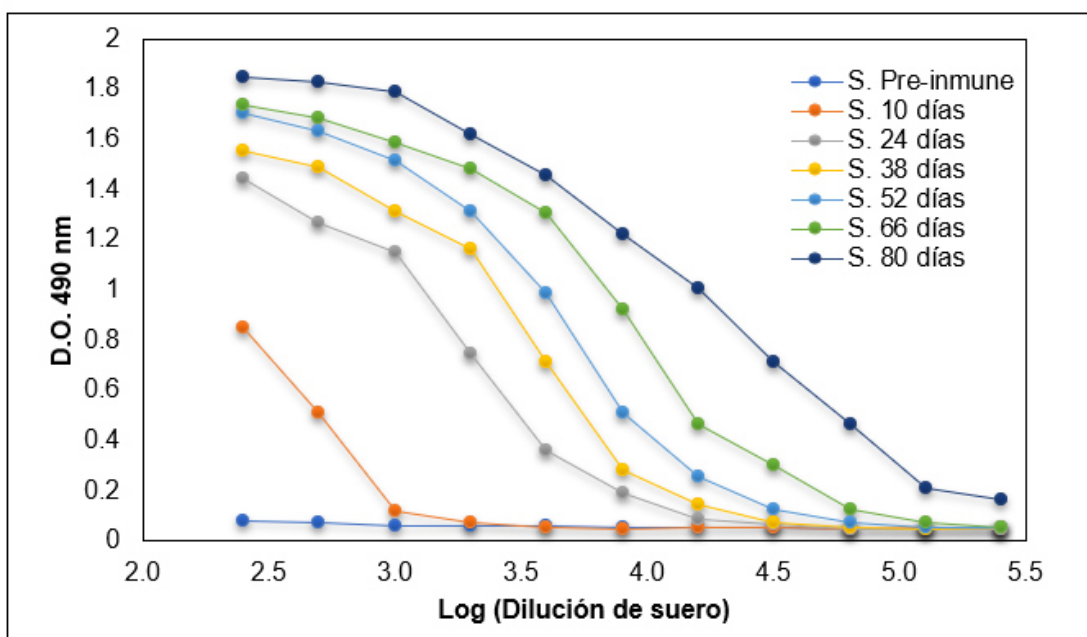
La miotoxina fue capaz de retardar el tiempo de coagulación del plasma humano. Teniendo como tiempo control 12 minutos y medio, agregando 100 µg de miotoxina el tiempo se extendía a  $80.50 \pm 6.36$  minutos. (Fig. 7).



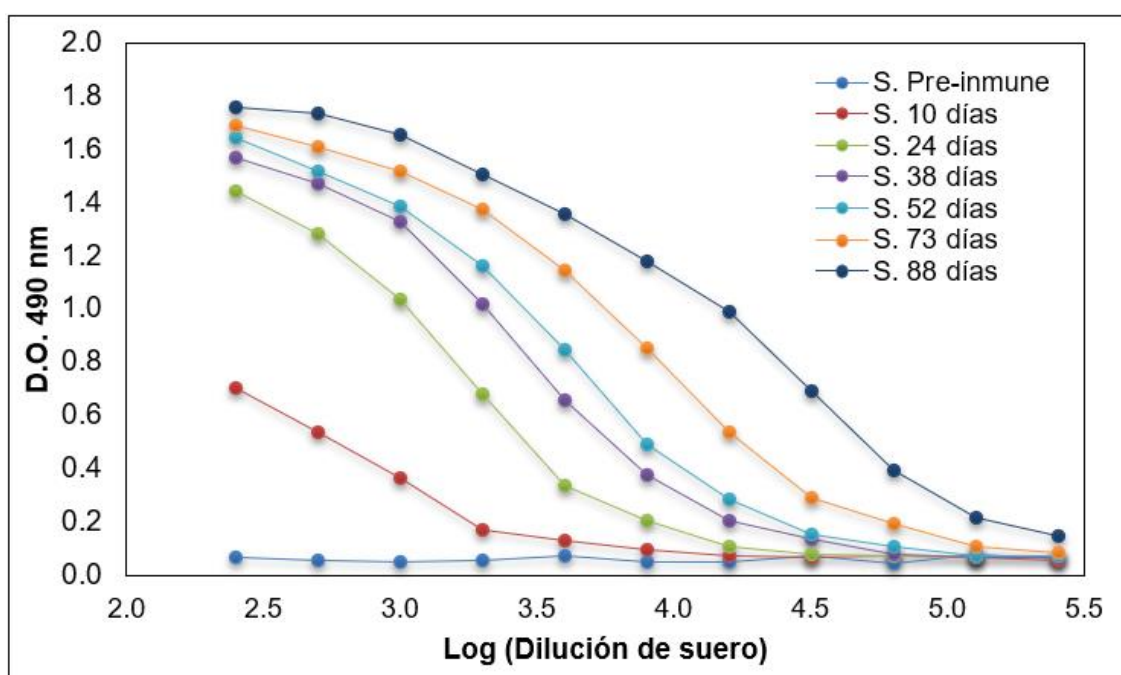
**Figura 7.** Actividad anticoagulante reflejada en el retardo de la coagulación del plasma humano citratado con 100 µg de miotoxina. Ensayos realizados por duplicado.

## 7. Detección y título de anticuerpos contra la miotoxina de *B. atrox*

El seguimiento de la respuesta inmune del conejo de experimentación inoculado con miotoxina fue realizado mediante la técnica ELISA, desde el día 0 hasta el día 80 del protocolo de inmunización (Fig. 8), alcanzando su máximo valor después de la quinta dosis de refuerzo (última), determinándose así que el título de anticuerpos anti-miotoxina de *B. atrox* en el suero obtenido al final del protocolo de inmunización fue de 16000. El mismo proceso se realizó para hacer el seguimiento del protocolo de inmunización del conejo de experimentación inoculado con veneno de *B. atrox*, desde el día 0 hasta el día 80 (Fig. 9). De manera similar, alcanza su máximo valor después de la quinta dosis de refuerzo, determinándose así que el título de anticuerpos fue de 16000.



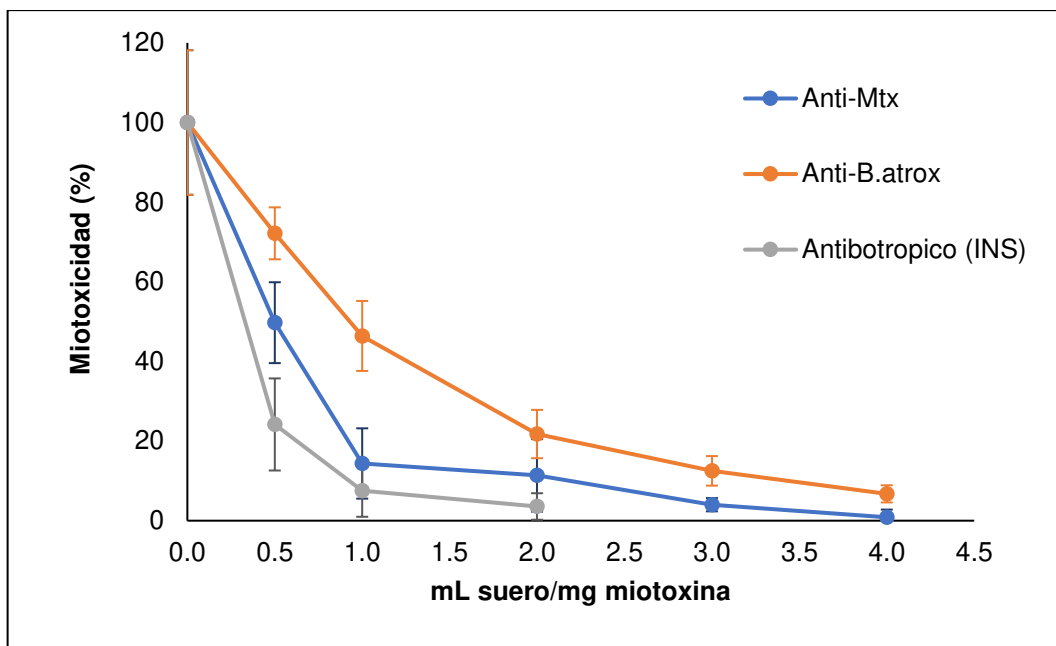
**Figura 8.** Detección de anticuerpos policlonales anti-mitoxina de *B. atrox* en el suero de conejos inmunizados mediante la técnica de ELISA.



**Figura 9.** Detección de anticuerpos policlonales anti-*B.atrox* en el suero de conejos inmunizados mediante la técnica de ELISA.

## 8. Neutralización de los anticuerpos anti-miotoxina

La actividad miotóxica fue inhibida significativamente por el suero anti-miotoxina, de manera dosis dependiente, con las relaciones 0.5, 1, 2, 3 y 4 (mL de suero: mg de miotoxina), lográndose una reducción de  $50.28 \pm 10.15$  % con la mínima relación y de  $99.15 \pm 1.92$  % con la máxima relación. Por otro lado, el suero anti-*B.atrox* también logró inhibir la actividad significativamente. Usando las mismas relaciones de mL de suero por mg de miotoxina, se logró una reducción de  $27.83 \pm 6.52$  % con la mínima relación y de  $93.16 \pm 2.15$  % con la máxima relación. Además, al usar el suero antibotrópico del INS como control positivo, con la relación 0.5 mL de suero por mg de miotoxina, la actividad miotóxica fue reducida en un  $75.84 \pm 11.56$  % y con la relación 2 mL de suero por mg de miotoxina, la actividad disminuyó un  $96.44 \pm 3.33$  % (Figura 10). Por último, las  $ED_{50}$  del suero anti-miotoxina, suero anti-*B.atrox* y suero antibotrópico del INS fueron de 0.34 mL de suero/mg de miotoxina, 0.93 mL de suero/mg de miotoxina y 0.1 mL de suero/mg de miotoxina, respectivamente.



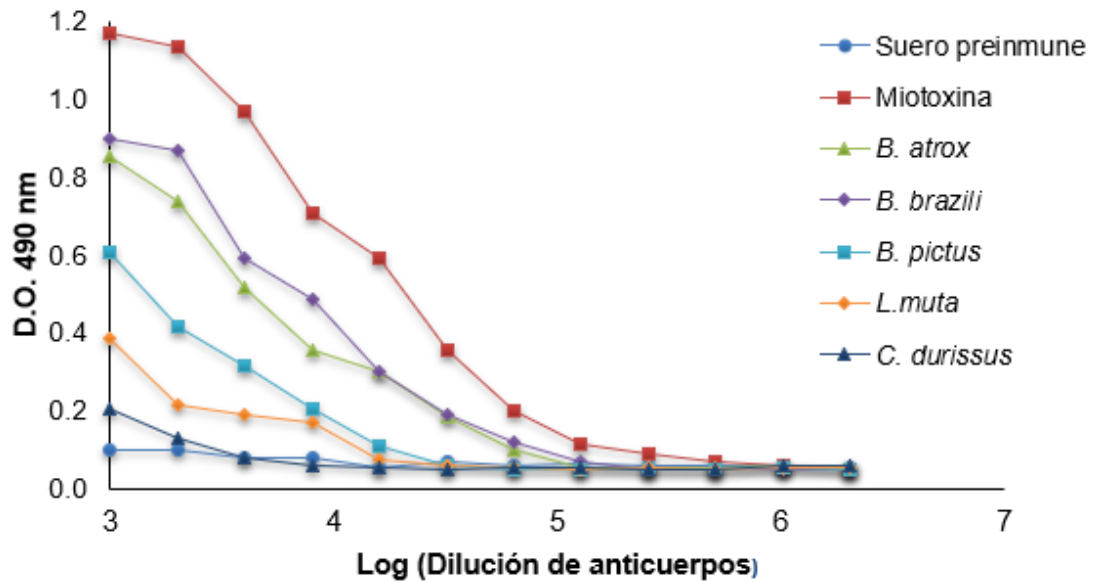
**Figura 10.** Neutralización de la actividad miotóxica de la miotoxina aislada del veneno de *B. atrox*. Cada punto está representado por la desviación estándar promedio del resultado para cuatro ratones. La neutralización del suero Anti-B.atrox fue significativa ( $p < 0.05$ ) a partir de 1 mL suero/mg de miotoxina, mientras que para el suero Anti-Mtx y el suero antibotrópico la neutralización fue significativa para todas las diluciones.

## 9. Análisis de la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-miotoxina

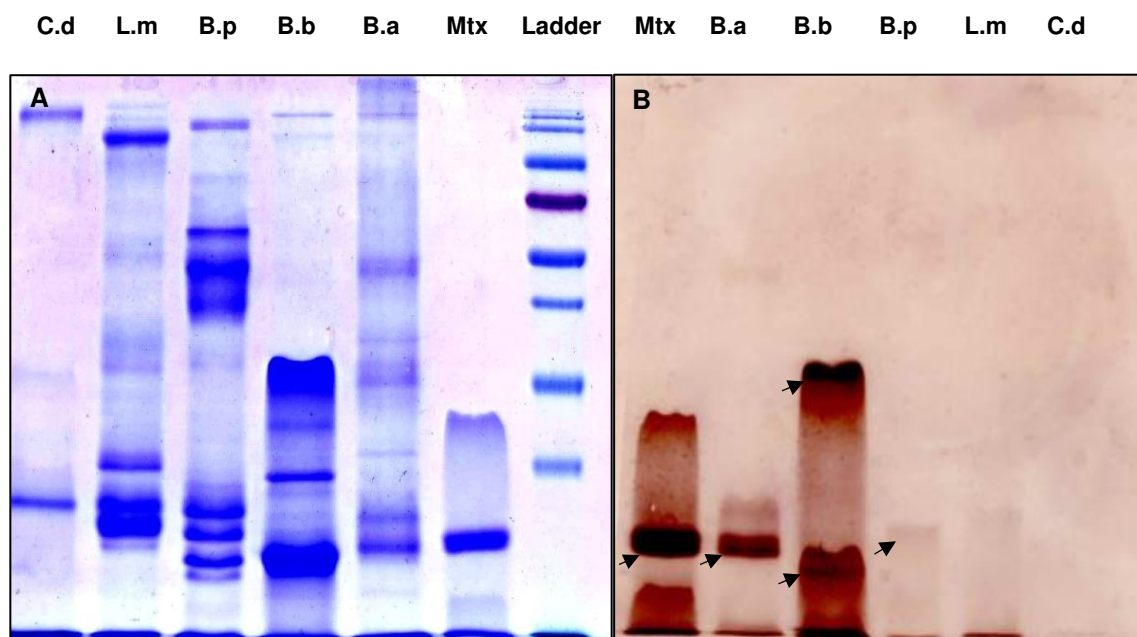
Al evaluarse, mediante la técnica ELISA, la reactividad cruzada del suero anti-miotoxina de *B. atrox* contra los venenos de *B. atrox*, *B. brazili*, *B. pictus*, *L. muta* y *C. durissus*, se observó que el suero anti-miotoxina fue capaz de reconocer a estos venenos a distintos títulos (Fig. 11). El suero reconoció a la miotoxina con un título de 16000, al veneno de *B. atrox* con un título de 8000, al veneno de *B. brazili* con un título de 10000, al veneno de *B. pictus* con un título de 4000, al veneno de *L. muta* con un título de 2000 y al veneno *C. durissus* con un título de 1000. Por otra parte, en los ensayos de Western Blot, se reconocieron bandas de un peso molecular en el rango de 19 a 22 kDa en los venenos de *B. atrox*, *B. brazili* y *B. pictus*. Adicionalmente, en *B. brazili* se reconoció también una banda de 35 kDa. En los venenos de *L. muta* y *C. durissus* no hubo reconocimiento de banda (Fig. 12). La prueba fue repetida con la



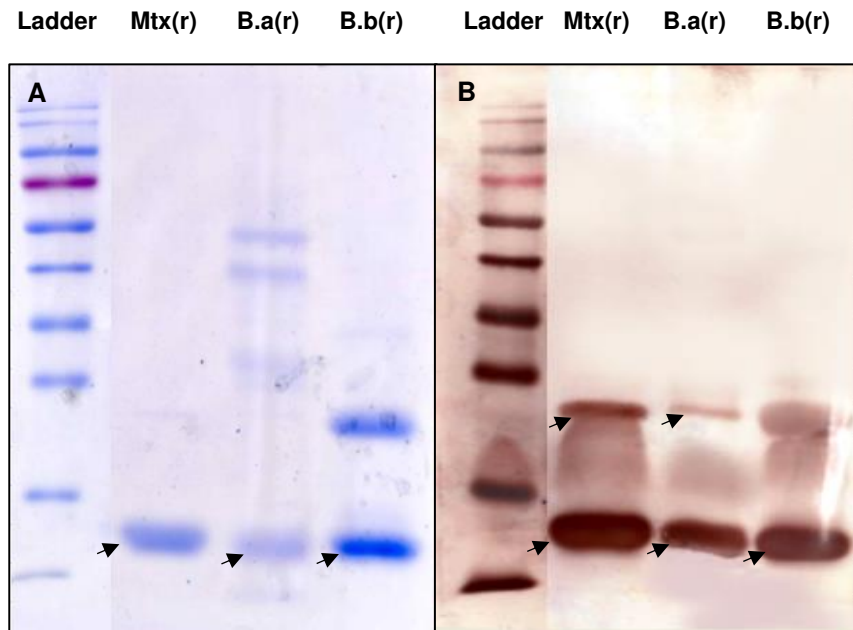
miotoxina, *B. atrox* y *B. brazili* a condiciones reductoras, reconociéndose en las tres muestras, bandas de 13 kDa y de 21 kDa (Fig. 13).



**Figura 11.** Evaluación de la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-miotoxina de *B. atrox* frente a algunos venenos de serpientes peruanas mediante la técnica de ELISA.



**Figura 12. (A)** Análisis electroforético (SDS-PAGE 12%) de la miotoxina purificada y los venenos de algunas serpientes peruanas. C.d.: *Crotalus durissus*, L.m: *Lachesis muta*, B.p: *Bothrops pictus*, B.b: *Bothrops brazili*, B.a: *Bothrops atrox*, Mtx: Miotoxina purificada de *B. atrox*, Ladder: Marcador de peso molecular. **(B)** Western Blot: Reactividad de los anticuerpos policlonales anti-miotoxina frente a los venenos de algunas serpientes peruanas.



**Figura 13. (A)** Análisis electroforético (SDS-PAGE 15 %) de la miotoxina purificada y los venenos de *B. atrox* y *B. brazili*, a condiciones reductoras. Ladder: Marcador de peso molecular, Mtx(r): Miotoxina purificada de *B. atrox*, B.a(r): *Bothrops atrox*, B.b(r): *Bothrops brazili*. **(B)** Western Blot: Reactividad de los anticuerpos policlonales anti-miotoxina frente a las muestras a condiciones reductoras.

## DISCUSIÓN

### 1. Purificación de la proteína

La caracterización de una proteína requiere de pasos de purificación que tomen en cuenta las propiedades físico-químicas de la misma, como su peso molecular, solubilidad, carga, etc.

En el caso de aquellas toxinas ofídicas que tienen una actividad directa en el tejido muscular, denominadas miotoxinas, la mayoría cuentan con un punto isoeléctrico básico (Jungo et al., 2012). Por lo que, los procesos de aislamiento suelen incluir un paso de cromatografía de intercambio catiónico para purificar a la toxina. Además, es común que las miotoxinas sean los últimos componentes que eluyen de este tipo de cromatografía a partir de una gradiente de sal, a pH neutro (Gutiérrez y Lomonte, 1995).

En la presente investigación se utilizó una cromatografía de intercambio catiónico, usando un método de purificación sobre CM-Sephadex C-25, resina que fue empleada también para purificar la miotoxina II de *Bothrops asper* (Lomonte et al. 1990) y una miotoxina de *B. atrox* de Colombia (Núñez et al., 2004).

Este tipo de resinas toman en cuenta la carga y el peso molecular de las proteínas. La resina CM-Sephadex C-25 es adecuada para separar proteínas básicas menores de 25 kDa del resto de proteínas. La resolución de una corrida cromatográfica puede ser variable, debido a que depende del flujo de la corrida; sin embargo, el patrón de picos obtenido es similar a otros gráficos de cromatografía obtenidos en los procesos de purificación de miotoxinas a partir del veneno de *B. atrox* (Huatuco et al., 2004), (Núñez et al., 2004). Por ejemplo, la miotoxina aislada siempre se concentra en las fracciones del último pico. A pesar de esto, puede haber diferencias notables en el porcentaje de composición de miotoxina en relación al veneno total. Por ejemplo, la

miotoxina aislada en este trabajo represento un 4.2 % del veneno total, otra miotoxina aislada del veneno de *B. atrox* de Perú (Huatuco et al., 2004), un 4.4 % del veneno total, y otra miotoxina aislada del veneno de *B. atrox* de Colombia, un 9 % aproximadamente (Núñez et al., 2004). En este punto, se debe recalcar las diferencias que puede haber en la composición de proteínas incluso entre serpientes de una misma especie. Muchos reportes han documentado distintos niveles de variación en la composición de los venenos, ya sea por variación taxonómica, edad, tamaño, ubicación geográfica, dieta, sexo y otros aspectos adaptativos (Mackessy et al., 2002). En Sudamérica se han encontrado diferencias marcadas entre la composición del veneno de *B. atrox*, dependiendo de la región a la que pertenece la serpiente. Los venenos de las *B. atrox* de Perú, Brasil y Ecuador se caracterizan por una abundante presencia de metaloproteasas tipo III, mientras que el veneno de *B. atrox* de Colombia resulta tener una mayor presencia de Lys49-PLA<sub>2</sub>s y metaloproteasas tipo 1 (Núñez et al., 2009). Estas diferencias no se limitan a regiones lejanas, en diferentes regiones de un mismo país, puede haber una variada proporción significativa de toxinas en el veneno dependiendo del ambiente en el que se encuentre la serpiente (Leijane et al., 2017). Este tipo de premisas explicaría, la variación de resultados que podría existir al emplear un determinado método de purificación de toxinas, así se trate de venenos procedentes de una misma especie. Además de esto, se debe tener en cuenta que en este trabajo la pureza total de la proteína no fue corroborada por una cromatografía de RP-HPLC, por lo que no se puede descartar la presencia de alguna proteína adicional, por más que esta no haya sido visualizada en los análisis de SDS-PAGE.

## **2. Determinación del peso molecular**

La proteína fue caracterizada como miotoxina porque las fracciones de la cromatografía evaluadas generaron un aumento de actividad CK en los ratones que fueron inoculados. La miotoxina en una SDS-PAGE a condiciones no reductoras muestra la presencia de dos bandas de similar intensidad: una de 13 kDa y otra de 24

kDa, mientras que a condiciones reductoras se muestra una banda muy tenue de 24 kDa y una banda intensa de 13 kDa (Fig. 5). La visualización de la miotoxina como mancha en una electroforesis a condiciones no reductoras, ha sido visto en otras PLA<sub>2</sub>s miotóxicas aisladas, específicamente provenientes de venenos de serpientes de género *Bothrops* (Núñez et al., 2004; Huatuco et al., 2004; De Roodt, 2018; Bustillo et al., 2019).

Para entender mejor este comportamiento electroforético se debe tener en cuenta el tipo de grupo de miotoxinas al cual puede pertenecer esta proteína. Las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 son proteínas básicas, su estructura primaria comprende entre 120 a 122 aminoácidos y, en su mayoría, existen como homodímeros. Las subunidades que comprenden el homodímero interactúan fuertemente a través de enlaces no covalentes, lo cual hace que detergentes como el SDS no logren disociarlo en su totalidad, a menos que sean tratados con agentes reductores como el 2β-mercaptoetanol (Lomonte y Rangel, 2012); sin embargo, si el efecto del agente reductor 2β-mercaptoetanol genera la disociación del dímero, se podría deducir que la unión de los monómeros de la miotoxina se da por enlaces disulfuro intercatenarios, los cuales no han sido visualizados en trabajos de difracción de rayos X. Esto llevó a que se realice un estudio que incluyó análisis electroforéticos y difracción de rayos X, mostrando que persistía la disociación del dímero a condiciones reductoras, a pesar de que no se formaban enlaces disulfuro intercatenarios en la estructura cristalizada (Matzui et al., 2019). El mismo estudio señala que existe una interacción entre las moléculas de SDS y la miotoxina, verificado por estudios de ultracentrifugación, los cuales especifican que la asociación de monómeros de miotoxina depende del número de enlaces con moléculas de SDS. Esta interacción se llevaría a cabo debido a que las moléculas de SDS actúan como análogos de fosfolípidos y esto conllevaría a que el SDS, indirectamente, forme un dímero estable de la proteína a condiciones no reductoras. Esta estabilidad del dímero se rompería a condiciones reductoras debido a que se

rompen los enlaces intracatenarios de la proteína y el cambio conformacional de la proteína ocasionaría que ya no pueda interactuar de manera estable con las moléculas de SDS. Por otro lado, a pesar de que el SDS sea responsable de la estabilidad del dímero de miotoxina, sigue siendo un agente surfactante que puede llegar a disociar parcialmente las interacciones no covalentes de la estructura proteica, lo que llevaría a que se generen productos de un grado de migración diferencial, lo cual se evidencia en una mancha en el gel de electroforesis (De Roodt, 2018).

Hasta el momento, se cuenta con la secuencia del gen de una PLA<sub>2</sub> Lys49 del veneno de *B. atrox* aislada en el laboratorio en el cual se realizó este trabajo; sin embargo, se requiere develar parcialmente la secuencia de aminoácidos de la proteína de esta tesis para corroborar que la anterior secuencia corresponde al gen que la expresa. Aun así, las características bioquímicas como la naturaleza básica o forma dimérica de la proteína remarcen la idea de que la miotoxina aislada se trate de una isoforma Lys49, además de que la metodología de purificación que se usó está basada en metodologías de purificación de otras PLA<sub>2</sub>-Lys49. Por ejemplo, la miotoxina II, aislada a partir del veneno de *B. asper* (Lomonte y Gutiérrez, 1989) y la miotoxina aislada a partir del veneno de *B. atrox* (Núñez et al., 2004) generaron un perfil cromatográfico muy similar al obtenido en este trabajo. Estas miotoxinas fueron obtenidas en el último pico, y gracias a que su estructura aminoacídica fue descifrada, estas miotoxinas fueron catalogadas como PLA<sub>2</sub>-Lys49. Esto último refuerza la hipótesis de que la proteína aislada pertenece a este grupo especial de miotoxinas.

### **3. Actividad enzimática de la miotoxina**

Una de las razones que puede contradecir la premisa de que esta proteína pertenece al grupo de PLA<sub>2</sub>s-Lys49 es la presencia de actividad fosfolipasa. Esta proteína presentó actividad fosfolipasa para ambos ensayos usados, pero sumamente baja si observamos su actividad específica en relación a la actividad del veneno (Tabla 2). La

actividad específica es el número de unidades enzimática por miligramo de proteína y constituye una medida de pureza enzimática: aumenta durante la purificación de una enzima y llega a su punto más alto y constante cuando la enzima está pura (Nelson y Cox, 2013). En otros cuadros de purificación de enzimas PLA<sub>2</sub>, la actividad específica de la enzima pura llega a aumentar más de 50 veces respecto al veneno total (Inga et al., 2011). A partir de esto, se puede considerar que el grado de actividad encontrada en la proteína es sumamente baja, ya que solo llega a aumentar 1.42 veces respecto a la actividad del veneno total. La baja o nula actividad enzimática en las fosfolipasas miotóxicas ha sido atribuida a un grupo en especial: Las PLA<sub>2</sub>s-Lys49.

Las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 no pueden interactuar con el ion calcio, cofactor necesario para que se produzca la actividad fosfolipasa. Estudios de cristalografía han demostrado que el grupo amino  $\epsilon$  de la Lys-49 se localiza en la posición ocupada por el ion  $\text{Ca}^{+2}$  en las PLA<sub>2</sub>s-Asp49 y esto resulta en la ausencia o reducción de la actividad catalítica por la baja o nula afinidad del ion  $\text{Ca}^{+2}$  con las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 (Holland et al., 1990). Por otro lado, se descubrió que moléculas de ácidos grasos se unían al sitio de unión de sustrato de las PLA<sub>2</sub>s-Lys49, región conservada en este grupo de proteínas. En primera instancia, este hecho sugería que las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 eran capaces de hidrolizar fosfolípidos (Lee et al., 2001). Hecho que era resaltado por la presencia de actividad catalítica en algunas PLA<sub>2</sub>s-Lys49 que habían sido purificadas (Maragonore et al., 1984; Shimohigashi et al., 1995); sin embargo, estudios de mutagénesis dirigida en PLA<sub>2</sub>s-Lys49 recombinantes demostraron que estas carecían completamente de actividad enzimática y que los ácidos grasos a los que se unían, eran productos PLA<sub>s</sub> endógenos del propio organismo que habían sido activadas. Esto llevó a sugerir que el nivel bajo de actividad catalítica observada en algunas PLA<sub>2</sub>s-Lys49 purificadas a partir de veneno, es debido a la presencia de impurezas de uno o más PLA<sub>2</sub>s catalíticamente activos (Ward et al., 2002). Es así que, aunque actualmente se sabe que la unión de los ácidos grasos a las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 sirve como activación alostérica



para que estas desencadenen su función (Borges et al., 2017), estos no son producto de una actividad catalítica.

Aun así, las miotoxinas Lys-49 siguen siendo catalogadas por una carencia de actividad enzimática (Núñez et al., 2004) o porque presentan una baja actividad enzimática si es que se compara con su contraparte (Asp-49) (Kanashiro et al., 2002). A pesar de tener poca o nula actividad enzimática, las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 tienen en común su notable inducción de mionecrosis.

#### **4. Actividad miotóxica**

En general, las miotoxinas encontradas en venenos de vipéridos no son tan potentes como sus contrapartes encontradas en elápidos; sin embargo, esta baja potencia es compensada por la gran cantidad de veneno que inoculan, sobre todo las serpientes del género *Bothrops*, y la alta concentración de miotoxina que pueden llegar a tener (Gutiérrez y Lomonte, 1995). Específicamente, las miotoxinas de venenos de vipéridos del tipo PLA<sub>2</sub>-Lys49 ejercen su acción solo a nivel local, es decir, solo afectan en el sitio de inoculación, a diferencia de otras, como la crotoxina, que tiene la capacidad de propagarse en distintos sitios anatómicos (Gutiérrez et al., 2008). Aunque suelen hacerse pruebas histológicas en puntos distintos al de la inoculación de la miotoxina para evaluar si la acción es local o sistémica, la evaluación de la cinética de la actividad CK en el plasma también sirve para verificarlo (Gutiérrez et al., 2008).

La actividad CK en el plasma alcanzó su punto más alto a las 2 horas y luego tuvo un rápido declive, a partir de aquí, hasta las 24 horas. Un aumento rápido y posterior declive de esta actividad ha sido asociado con el efecto local de la miotoxina. Esto es debido a que la actividad CK de las miotoxinas de efecto sistémico tienen un comportamiento opuesto, el punto más alto de actividad no se alcanza tan rápido y

esta actividad es mucho más prolongada (Gutiérrez et al., 2008). Este comportamiento diferencial se basa en que las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 además de unirse a células musculares, se unirían en menor medida a otro tipo de líneas celulares, por lo que el daño en el músculo sería menos prolongado debido a que esta interactuando con otros puntos de unión (Gutiérrez y Ownby, 2003). Al contrario, las miotoxinas de efecto sistémico tendrían una diana molecular específica. La crotoxina, por ejemplo, interactúa específicamente con una proteína de membrana de 45 a 48 kDa (Krizaj et al., 1997). No obstante, no se descarta la posibilidad de que el sarcolema presente proteínas de membrana que puedan ser importantes para la especificidad de las Lys49-PLA<sub>2</sub>.

Tomando en cuenta otras miotoxinas aisladas del veneno de *B. atrox*, la máxima actividad se encuentra en el rango de 1 a 4 horas (Lomonte et al., 1990b; Kanashiro et al., 2002; Huatuco et al., 2004; Núñez et al., 2004). Esta diferencia de grado de miotoxicidad a distinto tiempo, puede deberse a pequeñas diferencias que pueden tener estas proteínas homólogas a nivel de secuencia o a la considerable desviación estándar que suelen tener este tipo de ensayos, lo cual podría causar que genere que los ensayos no sean replicables. Por ejemplo, en la Fig. 5 se alcanza una desviación estándar de 20 %, mientras que en el gráfico de miotoxicidad a diferentes tiempos de una miotoxina de *B. atrox* colombiana, la desviación estándar de la actividad CK alcanza el 50 % (Núñez et al., 2004). Este grado de diferencia se explica porque la liberación de la enzima CK está relacionada con la lisis de las células musculares, la cual no necesariamente puede estar relacionada con la acción de la miotoxina, sino que también puede estar relacionada con el daño que se genera en la inoculación en los ratones y la forma en la que se extrae sangre de los mismos.

Como se menciona al comienzo, el grado de miotoxicidad de las serpientes del género *Bothrops* es relativamente bajo. Aunque por recomendación, se establece la DMM como parámetro para conocer el grado de miotoxicidad (Instituto Clodomiro Picado,

2007). Este dato muchas veces no se menciona en los trabajos que evalúan la toxicidad de las miotoxinas aisladas, teniendo solo como referencia de comparación a los gráficos de actividad CK (U/L) por  $\mu\text{g}$  de proteína. De manera específica, en una miotoxina de *B. atrox* fue observada que la miotoxicidad alcanzaba las 4000 U/L (Kanashiro et al., 2002) hasta las 6000 U/L (Lomonte et al., 1990b) (Núñez et al., 2004). La miotoxina aislada en este trabajo alcanzó las 2500 U/L, la cual la cataloga como una miotoxina de menor potencia miotóxica a las proteínas homólogas anteriormente mencionadas.

La DMM de la miotoxina fue de 12.3  $\mu\text{g}$  y del veneno total de *B. atrox*, de 23.5  $\mu\text{g}$ . La diferencia entre el grado de miotoxicidad de la miotoxina y el veneno total toma en cuenta varios factores. La miotoxicidad como tal no depende de una sola proteína, puede ser desarrollada indirectamente por metaloproteasas, además estas últimas junto a PLA<sub>2</sub>s ácidas y una acción sinérgica pueden desarrollar miotoxicidad (Bustillo et al., 2012). Así también, las PLA<sub>2</sub>s ácidas pueden actuar en conjunto con PLA<sub>2</sub>s básicas miotóxicas, potenciando la actividad de estas últimas (Mora-Obando et al., 2012). Por esto, resulta curioso que la miotoxicidad de una toxina resulte más fuerte que la del veneno total, el cual tiene más componentes que generan miotoxicidad o la potencien. No obstante, este resultado puede demostrar que la miotoxina aislada es un componente importante de la miotoxicidad desencadenada por el veneno de *B. atrox*.

Aunque la miotoxicidad es una actividad ligada al envenenamiento por *B. atrox*, esta puede ser bastante variable. Los venenos de *B. atrox* pueden llegar a tener una composición distinta dependiendo de la región geográfica en la cual se ubican. Las *B. atrox* de Colombia tienen un 18.5 % de PLA<sub>2</sub>s-Lys49 y un 48.5 % de metaloproteasas. Mientras que en las *B. atrox* de Brasil hay un predominio de metaloproteasas (72.1 %) frente a las PLA<sub>2</sub>s-Lys49 (2.5 %). Esta división geográfica realizada gracias a estudios

proteómicos también resalta la similitud de los venenos de *B. atrox* de Perú y Ecuador, los cuales también se caracterizan por la predominancia de metaloproteasas en su composición (Núñez et al., 2009). De hecho, un estudio proteómico es particular para el veneno de *B. atrox* de Perú confirma este aspecto. El veneno resultó estar compuesto por un 58.2% de metaloproteasas y un 11% de PLA<sub>2</sub>s, entre las cuales se encuentran miotóxicas y no miotóxicas (Kohlhoff et al., 2012). Esto es resaltado cuando se evalúa la miotoxicidad del veneno. Se ha reportado que el veneno de *B. atrox* de Perú puede llegar a tener una DMM de 56.30±9.93 µg (Rojas et al., 2005). Así como aproximadamente 500 U/L de actividad miotóxica con 50 µg de veneno (Segura et al., 2010). Ambos parámetros resultan ser más altos que los obtenidos en este trabajo. La DMM del veneno de *B. atrox* fue de 23.5 µg y con 50 de veneno se alcanzó aproximadamente las 1000 U/L de actividad miotóxica. Aunque hay variación en la actividad miotóxica del veneno respecto a reportes anteriores, hay que tener que la variación de la composición proteica puede existir en venenos de serpientes de un mismo país (Leijane et al., 2017). Es así que, solo un estudio que evalúe la composición proteica y las actividades tóxicas del veneno de *B. atrox* específicas de una región del Perú pueden ayudar a tener una noción más clara del nivel de miotoxicidad del veneno de *B. atrox* peruana.

## **5. Actividad edemática**

Dado que existe un efecto directo por parte de las fosfolipasas miotóxicas en la membrana, hay muchos efectos que pueden desencadenar indirectamente, ya sea la disrupción de liposomas, acción bactericida, acción antifúngica y acción citotóxica; sin embargo, este tipo de proteínas desencadenan otras actividades que están relacionadas con la inflamación. Entre estas se encuentran la generación de edemas, liberación de citocinas e hiperalgesia (Lomonte et al., 2009b).

Un edema llega a ser la inflamación del tejido por acumulación de fluidos en los espacios intersticiales. Todas las fosfolipasas miotóxicas aisladas hasta la fecha, al menos las del género *Bothrops* cuentan con esta propiedad, la cual parece ser desencadenada por la región C-terminal de la proteína (Núñez et al., 2001). La miotoxina aislada cuenta con una DEM de 26  $\mu$ g, valor relativamente alto si se compara con la DEM de 16  $\mu$ g de la miotoxina aislada del veneno de *B. atrox* colombiana (Núñez et al., 2004). Lo cual indica que la miotoxina del veneno de *B. atrox* peruana tiene una menor actividad edemática.

## **6. Actividad anticoagulante**

Aunque las actividades relacionadas a la degradación de membranas y a la inflamación son efectos que frecuentemente desencadenan las fosfolipasas miotóxicas, hay una serie de efectos que no todas logran desencadenar. Las PLA<sub>2</sub>s, sin importar si son miotóxicas o no, son responsables de evitar la formación de coágulo. Esto debido a que en la cascada de coagulación participan algunos fosfolípidos, por ejemplo, los que forman el factor tisular, y estos llegarían a ser degradadas debido a la actividad enzimática de la fosfolipasa. En trabajos anteriores, ensayos de alquilación en el sitio catalítico de la PLA<sub>2</sub> evitaron que la proteína generé actividad anticoagulante, lo cual sugirió la idea de que la actividad enzimática es esencial para la actividad anticoagulante (Verheij et al., 1980). En el caso específico de las fosfolipasas miotóxicas pasa lo mismo. Cuando se detecta actividad enzimática, se logra detectar actividad anticoagulante. La miotoxina reportada en este trabajo tiene efecto anticoagulante, lo cual tiene sentido si se toma en cuenta la actividad enzimática ya reportada por parte de la proteína. Anteriormente ya se había reportada una miotoxina del veneno de *B. atrox* con actividad anticoagulante (Lomonte et al., 1990b), así como también otra sin actividad (Núñez et al., 2004).

## 7. Inmunogenicidad y neutralización

La producción de anticuerpos policlonales a partir de una toxina resulta útil para estudios de neutralización, corroborar la presencia de determinantes antigénicos en miotoxinas de diferentes venenos y observar la contribución relativa de esta toxina en el daño muscular que genera el veneno total.

El protocolo de inmunización elaborado para obtener anticuerpos contra la miotoxina de *B. asper* (Lomonte et al., 1987), el cual fue tomado como referencia en este trabajo, tomó en cuenta una primera inmunización por vía intramuscular e inmunizaciones de refuerzo por vía subcutánea. El músculo es considerado un buen sitio para la inoculación de antígenos de bajo peso molecular con propiedades irritantes, debido a que en este punto la absorción en la sangre es rápida, lo que permite que el foco de inflamación sea rápidamente dispersado (O'Driscoll, 1992). Por otro lado, la vía subcutánea provee una absorción del antígeno más lenta; sin embargo, es muchas veces usada como inoculaciones de refuerzo de antígenos que tienen riesgo de reacciones anafilácticas. Además, el nivel de propagación del antígeno inoculado por vía subcutánea se puede ver favorecido por el tipo de piel del animal inoculado, teniendo los animales de piel suelta (conejos) una mayor área de dispersión para el antígeno (Hanly et al., 1995).

Adicionalmente a la vía de inoculación elegida, se debe tener en cuenta la naturaleza del antígeno y su toxicidad (Heneine y Heneine, 2001). Por ejemplo, para producir altos títulos de anticuerpos a partir de una enzima similar a trombina (EST) del veneno de *B. atrox*, fue necesario inmunizar conejos con 150 µg de proteína (Sandoval et al., 2015), mientras que para generar anticuerpos en conejos a partir de PLA<sub>2</sub> miotóxica, se usaron entre 1 a 2 mg de proteína (Lomonte et al., 1987) y 3 mg de proteína (García Denegri et al., 2014). La diferencia de cantidad de antígeno necesario para una proteína u otra, podría resaltar la poca inmunogenicidad que tiene la miotoxina

frente a la EST, teniendo en cuenta que ambas tienen pesos moleculares similares; sin embargo, esta poca inmunogenicidad fue reforzada por la emulsificación de la proteína con el adyuvante completo de Freund (CFA) para la primera inmunización y con el adyuvante incompleto de Freund (IFA) para las inmunizaciones de refuerzo. Ambos coadyuvantes tienen la capacidad de mantener a los antígenos en la zona de inoculación por un periodo de tiempo prolongado, permitiendo una mayor producción de anticuerpos (Herbert y Lumsden, 1968). La producción de anticuerpos a partir del protocolo de inmunización utilizado en este trabajo, cuya duración fue de 80 días, fue monitoreado por la técnica de ELISA. A partir de esto, se observó una producción sostenida de anticuerpos desde la primera inoculación hasta el final del protocolo. Así, el protocolo empleado resultó práctico y eficiente para la obtención de anticuerpos contra la miotoxina de *B. atrox*.

La capacidad neutralizante de los anticuerpos fue evaluada mediante ensayos de neutralización *in vivo* en ratones, usando la estrategia de “tipo preincubación”. Esta estrategia consiste en incubar *in vitro* la mezcla de antígeno y anticuerpo durante un periodo de tiempo y realizar con la mezcla una determinada actividad, en este caso la miotóxica, comparándola con la actividad que realizaría solo el antígeno. Si bien este proceso experimental provee información sobre la capacidad intrínseca del anticuerpo para bloquear al antígeno, no se asemeja a la neutralización usada para el uso terapéutico (Gutiérrez et al., 1990); sin embargo, para imitar los métodos de neutralización terapéutica, se requiere conocer parámetros farmacocinéticos tanto de la toxina como del anticuerpo, así como la velocidad a la que se desarrollan los efectos tóxicos. Por ello, los ensayos de neutralización de tipo preincubación sirven como una buena estrategia para tener un conocimiento básico de la neutralización (Lomonte et al., 2009a).

Los ensayos de neutralización se realizaron con el suero antibotrópico del INS, el suero anti-miotoxina obtenido y un suero obtenido a partir de la inoculación de veneno de *B. atrox* en conejo (Suero anti-*B.atrox*). Teniendo como dosis reto 36.9 µg de miotoxina y usando 0.5 mL de suero por mg de miotoxina, se neutralizó aproximadamente un 50 % de la miotoxicidad con el suero anti-miotoxina, un 28% de la miotoxicidad con el suero anti-*B.atrox* y un 76% de la miotoxicidad con el suero antibotrópico del INS. Antes de realizar la comparación, se debe tener en cuenta que los sueros producidos en conejo no han sido fraccionados y los anticuerpos no han sido purificados, desconociendo la concentración absoluta de los anticuerpos específicos. Mientras que, el suero antibotrópico del INS es una preparación rica en globulinas ya purificadas, cuyo proceso de producción ya está completamente estandarizado. Es así que, el modo de preparación de los sueros explica la mayor capacidad de neutralización que ofrece el suero antibotrópico del INS, a pesar de que deriva de la inmunización del veneno total de 5 especies del género *Bothrops* y, por ende, contiene anticuerpos contra otras proteínas y/o toxinas. Por otro lado, el suero anti-*B.atrox* también cuenta con anticuerpos para otras proteínas del veneno de *B. atrox*, pero dado que es un suero no fraccionado ni purificado al igual que el suero anti-miotoxina, su nivel de reducción de miotoxicidad es menor. Se debe señalar que se utilizó 0.5 mg de veneno de *B. atrox* para producir este suero frente a 1 mg de miotoxina que se utilizó para producir el suero anti-miotoxina, lo cual da a entender que, aparentemente, se pueden producir cantidades adecuadas de anticuerpo contra miotoxina con una menor cantidad a la que se usó.

Cabe recalcar que los resultados de neutralización solo demuestran la unión de los anticuerpos policlonales con la miotoxina. Ensayos de neutralización de tipo terapéutico señalan que los antivenenos son inefectivos para neutralizar la miotoxicidad local, debido a la rápida acción de las PLA<sub>2</sub>s en las células musculares (Gutiérrez et al., 1998, 2008).



## 8. Reactividad cruzada

Los anticuerpos policlonales del suero anti-miotoxina fueron capaces de reconocer diferentes venenos de serpientes peruanas a través del ensayo ELISA. El nivel de reconocimiento fue mayor para el veneno de *B. brazili*, seguida de *B. atrox* y *B. pictus*. El nivel de reconocimiento en *L. muta* fue muy bajo y en *C. durissus*, casi nulo. Este nivel de reconocimiento estaría asociado a la cantidad de proteínas antigénicamente relacionadas a la miotoxina aislada de *B. atrox* que se encuentran en estos venenos, las cuales serían proteínas homólogas a PLA<sub>2</sub>s. La PLA<sub>2</sub> miotóxica como tal, ha demostrado ser una proteína antigénicamente conservada, al menos en los venenos del género *Bothrops*, perdiéndose este grado de conservación cuando se evalúan venenos de serpientes de otros géneros (Lomonte et al., 1990c). Este grado de conservación no solo se limita a PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, sino que se mantiene parcialmente en otras isoformas de PLA<sub>2</sub>, siendo éstas últimas también reconocidas por anticuerpos policlonales (Lomonte et al., 1990a).

En este trabajo se corrobora la conservación de las PLA<sub>2</sub>s, la cual se va perdiendo en venenos de serpiente de diferente género. Cabe remarcar que el nivel de reconocimiento con otros venenos no solo está asociado a la conservación de la PLA<sub>2</sub> sino también a la cantidad de PLA<sub>2</sub> y de isoformas que podrían existir en el veneno. Por ejemplo, hay un mayor reconocimiento del suero anti-miotoxina para *B. brazili* que para *B. atrox*, a pesar de que el suero deriva de una miotoxina de *B. atrox*. Para comprender esto, se debe tener en cuenta que la cantidad de miotoxina aislada en este trabajo representó un 4.2% del veneno de *B. atrox*, según la cromatografía realizada, mientras que, en otro trabajo, la miotoxina en veneno de *B. brazili* peruana constituyó el 25% (Pantigoso et al., 2001). En cuanto a *B. pictus*, no hay reportes de que se hayan aislado PLA<sub>2</sub> miotóxicas, pero si se ha demostrado que los contiene, a partir de ensayos de reactividad cruzada con anticuerpos de miotoxina de *B. asper*. En estos ensayos, existió mayor reconocimiento en el veneno de *B. pictus* que en los

venenos de *B. atrox* y *B. brazili* peruanas, por lo cual se puede inferir una mayor similitud antigénica o una mayor cantidad de isoformas de PLA<sub>2</sub>s en el veneno de *B. pictus* (Lomonte et al., 1990c).

Por otro lado, los venenos de *L. muta* y *C. durissus* si bien cuentan con efectos miotóxicos, la manera en la que se da es distinta tanto por el grado del efecto, así como por las proteínas que la desencadenan. Entre los distintos efectos del envenenamiento por *L. muta*, figura la miotoxicidad (Otero et al., 1998), aunque el efecto es relativamente bajo si se compara con el efecto miotóxico del género *Bothrops* (Kuch et al., 1996), y las pocas miotoxinas aisladas representa un porcentaje muy bajo del veneno total (2%), aunque logran tener un alto porcentaje de similitud de secuencia con fosfolipasas miotóxicas de veneno de serpientes del género *Bothrops* (más del 90%) (Diniz-Sousa et al., 2018). Respecto al envenenamiento por *C. durissus*, este presenta un marcado efecto miotóxico sistémico, pero por proteínas distintas a las PLA<sub>2</sub>s-Lys49. Esta miotoxicidad es desencadenada por un grupo de pequeños polipéptidos de bajo peso molecular (Oguiura et al., 2005), y por múltiples isoformas de una proteína dimérica denominada crotoxina, la cual cuenta con una subunidad homóloga a una PLA<sub>2</sub> y con otra subunidad totalmente distinta (Faure et al., 1994). La baja cantidad de proteínas homologas a las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas explicaría el bajo reconocimiento del suero producido frente al veneno de *C. durissus*.

Los resultados de las pruebas de ELISA contrastan con los resultados de las pruebas de Western Blot. Existió reconocimiento de bandas en los venenos de *B. atrox*, *B. brazili* y *B. pictus*, más no en *L. muta* y *C. durissus*. Teniendo a la miotoxina pura como control positivo, se visualiza que las bandas reconocidas presentan el mismo tamaño y, por tanto, es muy probable que se traten de proteínas homologas. Sorpresivamente, se reconoció una banda adicional de 35 kDa en el veneno de *B. brazili*. Para refutar la idea de que se tratara de un falso positivo, el ensayo de Western Blot fue repetido,

pero a condiciones reductoras. Bajo estas condiciones, en los venenos de *B. atrox* y *B. brazili* existió el reconocimiento de una banda de 13 kDa, desapareciendo la banda de 35 kDa tanto en el ensayo de Western Blot como en la SDS-PAGE, infiriendo que esta banda pudo haber sido un polímero de isoforma de miotoxina. Las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas aisladas en *B. brazili* han sido catalogadas como diméricas y de un peso aproximado de 28 a 30 kDa (Pantigoso et al., 2001; Costa et al., 2008). La diferencia de migración en la electroforesis aquí mostrada podría dilucidarse mejor con el aislamiento de esta proteína, que, aunque a partir de la prueba a condiciones reductoras da a entender que se trata de un polímero de miotoxina, no explica porque tuvo un grado de migración diferente a la miotoxina en *B. atrox* y *B. pictus*.

## CONCLUSIONES

- La PLA<sub>2</sub> miotóxica es una proteína básica, dimérica con una banda de 13 kDa y 24 kDa en condiciones reductoras y no reductoras respectivamente, que constituye el 4.2 % del veneno total de *B. atrox*.
- La PLA<sub>2</sub> miotóxica aislada presentó una actividad enzimática PLA<sub>2</sub> de 2.58±0.19 U/mg, una dosis miotóxica mínima de 12.30±0.95 µg, una dosis edemática mínima de 26.00±1.15 µg y generó un retardo de coagulación de 80.50±6.36 minutos por 100 µg de proteína.
- Las ED<sub>50</sub> del suero anti-miotoxina, suero anti-*B. atrox* y suero antibotrópico del INS fueron de 0.34 mL de suero/mg de miotoxina, 0.93 mL de suero/mg de miotoxina y 0.1 mL de suero/mg de miotoxina, respectivamente.
- Los anticuerpos anti-miotoxina tuvieron reactividad cruzada frente a los venenos de *B. brazili* (título de 10000), *B. atrox* (título de 8000), *B. pictus* (título de 4000), *L. muta* (título de 2000) y *C. durissus* (título de 1000).
- Los anticuerpos anti-miotoxina reconocieron, en condiciones reductoras, bandas de 21 kDa aproximadamente en los venenos de *B. atrox*, *B. brazili* y *B. pictus*. Mientras que, a condiciones no reductoras, se reconocieron bandas de 13 kDa y 21 kDa en *B. atrox* y *B. brazili*.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Alzamora L, Colona E, Vizcarra M. Manual de prácticas de inmunoserología. Primera ed. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas; 2002.
2. Arni RK, Ward RJ. -Phospholipase A<sub>2</sub>--A structural review. *Toxicon*. 1996 Aug 1;34(8):827-42.
3. Borges RJ, Lemke N, Fontes MR. PLA<sub>2</sub>-like proteins myotoxic mechanism: a dynamic model description. *Scientific reports*. 2017 Nov 14;7(1):1-2.
4. Bustillo S, Gay CC, Denegri ME, Ponce-Soto LA, de Kier Joffé EB, Acosta O, Leiva LC. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon*. 2012 Feb 1;59(2):338-43.
5. Bustillo S, Fernández J, Chaves-Araya S, Angulo Y, Leiva LC, Lomonte B. Isolation of two basic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants. *Toxicon*. 2019 Oct 1; 168:113-21.
6. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of mass spectrometry*. 2007 Nov;42(11):1405-14.
7. Cameron DL, Tu AT. Chemical and functional homology of myotoxin a from prairie rattlesnake venom and crotoxin from South American rattlesnake venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*. 1978 Jan 25;532(1):147-54.
8. Chang CC. The action of snake venoms on nerve and muscle. In *Snake venoms* 1979 (pp. 309-376). Springer, Berlin, Heidelberg.
9. Chippaux JP. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2017 Dec;23(1):1-2.

10. Costa TR, Menaldo DL, Oliveira CZ, Santos-Filho NA, Teixeira SS, Nomizo A, Fuly AL, Monteiro MC, de Souza BM, Palma MS, Stabeli RG. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. peptides. 2008 Oct 1;29(10):1645-56.
11. De Oliveira MR, Palma MS. Polybitoxins: a group of phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). Toxicon. 1998 Jan 1;36(1):189-99.
12. De Roodt A, Fernández J, Solano D, Lomonte B. A myotoxic Lys49 phospholipase A<sub>2</sub>-homologue is the major component of the venom of *Bothrops cotiara* from Misiones, Argentina. Toxicon. 2018 Jun 15; 148:143-8.
13. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. Chemical reviews. 2011 Oct 12;111(10):6130-85.
14. Diniz-Sousa R, Caldeira CA, Kayano AM, Paloschi MV, Pimenta DC, Simões-Silva R, Ferreira AS, Zanchi FB, Matos NB, Grabner FP, Calderon LA. Identification of the Molecular Determinants of the Antibacterial Activity of LmutTX, a Lys49 Phospholipase A<sub>2</sub> Homologue Isolated from *Lachesis muta muta* Snake Venom (Linnaeus, 1766). Basic & clinical pharmacology & toxicology. 2018 Apr;122(4):413-23.
15. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971 Sep 1;8(9):871-4.
16. Faure G, Choumet V, Bouchier C, Camoin L, Guillaume JL, Monegier B, Vuilhorgne M, Bon C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. European Journal of Biochemistry. 1994 Jul;223(1):161-4.

17. Fernandes CA, Comparetti EJ, Borges RJ, Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Soares AM, Fontes MR. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A<sub>2</sub>-like from *Bothrops brazili* venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013 Dec 1;1834(12):2772-81.
18. Ferreira ML, Moura-da-Silva AM, Mota I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon*. 1992 Dec 1;30(12):1591-602.
19. Fuentes Paredes F, Mendoza Yanavilca RA, Rivera Rodríguez R, Vara Márquez MD. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos. 2010.
20. Fuentes Paredes FD, Mendoza Yanavilca RA, Rosales Fernández AL, Cisneros Tarmeño RA. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. 2010.
21. Denegri ME, Maruñak S, Todaro JS, Ponce-Soto LA, Acosta O, Leiva L. Neutralization of the pharmacological activities of *Bothrops alternatus* venom by anti-PLA<sub>2</sub> IgGs. *Toxicon*. 2014 Aug 1; 86:89-95.
22. Gutiérrez JM, Arroyo O, Bolaños R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*. 1980 Jan 1;18(5-6):603-10.
23. Gutiérrez J, Ownby CL, Odell GV. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*. 1984 Jan 1;22(1):115-28.
24. Gutiérrez J, Lomonte B, Cerdas L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon*. 1986a Jan 1;24(9):885-94.
25. Gutiérrez J, Lomonte B, Chaves F, Moreno E, Cerdas L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake

- Bothrops asper*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. 1986b Jan 1;84(1):159-64.
26. Gutiérrez JM, Rojas Céspedes G, Lomonte B, Gené JA, Chaves Mora F, Alvarado J, Rojas Umaña E. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. 1990 Jun 5; 28(10):1127-29.
27. Gutiérrez J, Lomonte B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon. 1995 Nov 1;33(11):1405-24.
28. Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon. 1998 Nov 1;36(11):1529-38.
29. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon. 2003 Dec 1;42(8):915-31.
30. Gutiérrez JM, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Lomonte B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A<sub>2</sub>: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. Toxicon. 2008 Jan 1;51(1):80-92.
31. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. Toxicon. 2010 Dec 15;56(7):1223-35.
32. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Nature reviews Disease primers. 2017 Sep 14;3(1):1-21.
33. Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. ILAR journal. 1995 Jan 1;37(3):93-118.
34. Harrison RA. Development of venom toxin-specific antibodies by DNA immunisation: rationale and strategies to improve therapy of viper envenoming. Vaccine. 2004 Apr 16;22(13-14):1648-55.



35. Hawgood BJ. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. *Rattlesnake venoms*. 1982; pp 121-162.
36. Heneine LG, Heneine IF. Modification of biological properties of protein toxins by stepwise iodination. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 2001 Jan 1;20(3-4):209-28.
37. Herbert WJ, Lumsden WH. Single-dose vaccination of mice against experimental infection with *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei*. *Journal of medical microbiology*. 1968 Aug 1;1(1):23-32.
38. Holland DR, Clancy LL, Muchmore SW, Ryde TJ, Einspahr HM, Finzel BC, Heinrikson RL, Watenpaugh KD. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 1990 Oct 15;265(29):17649-56.
39. Howes JM, Theakston RD, Laing GD. Antigenic relationships and relative immunogenicities of isolated metalloproteinases from *Echis ocellatus* venom. *Toxicon*. 2005 Apr 1;45(5):677-80.
40. Huatuco, S., Escobar, E., & Yarlequé, A. (2004). Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). *Revista Peruana de Biología*, 11(1), 79-86.
41. Inga R, Vivas D, Palermo P, Mendoza J, Lazo F, Yarlequé A. Caracterización biológica y acción de inhibidores de una fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de *Lachesis muta*. *Revista peruana de biología*. 2010 Apr;17(1):123-28.
42. Instituto Clodomiro Picado. Determinación de Actividades Tóxicas de Venenos de Serpientes y su Neutralización por Antivenenos: Manual de Métodos de Laboratorio. 2007.
43. Jungo F, Bougueleret L, Xenarios I, Poux S. The UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot program: a central hub of integrated venom protein data. *Toxicon*. 2012 Sep 15;60(4):551-57.

44. Kanashiro MM, Rita de Cássia ME, Petretski JH, Prates MV, Alves EW, Machado OL, da Silva WD, Kipnis TL. Biochemical and biological properties of phospholipases  $A_2$  from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochemical Pharmacology*. 2002 Oct 1;64(7):1179-86.
45. Kohlhoff M, Borges MH, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez EF. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *Journal of proteomics*. 2012 Apr 3;75(7):2181-95.
46. Križaj I, Faure G, Gubenšek F, Bon C. Neurotoxic phospholipases  $A_2$  ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry*. 1997 Mar 11;36(10):2779-87.
47. Kuch U, Mebs D, Gutiérrez JM, Freire A. Biochemical and biological characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). *Toxicon*. 1996 Jun 1;34(6):714-17.
48. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227(5259):680-85.
49. Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A. Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A en venenos de serpientes. *Revista Peruana de Biología*. 1998;5(2):098-102.
50. Lee WH, da Silva Giotto MT, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I, Garratt RC. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases  $A_2$  - A hypothesis: The crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry*. 2001 Jan 9;40(1):28-36.
51. Loayza S, Morante Y, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*. 1985 Sep ;52(3):151-63.

52. Lomonte B, Gutiérrez J, Mata E. Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 1985 Jan 1;23(5):807-13.
53. Lomonte B, Gutiérrez J, Moreno E, Cerdas L. Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1987 Jan 1;25(4):443-49.
54. Lomonte B, Gutiérrez J, Carmona E, Rovira ME. Equine antibodies to *Bothrops asper* myotoxin II: isolation from polyvalent antivenom and neutralizing ability. *Toxicon*. 1990a Jan 1;28(4):379-84.
55. Lomonte B, Gutiérrez J, Furtado M, Otero R, Rosso JP, Vargas O, Carmona E, Rovira ME. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*. 1990b Jan 1;28(10):1137-46.
56. Lomonte B, Furtado MD, Rovira Rodríguez ME, Carmona Morera E, Rojas Céspedes G, Aymerich Blen R, Gutiérrez JM. South American snake venom proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxins. *Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas*. 1990c; 23(5):427-35.
57. Lomonte B, Leon G, Angulo Y, Rucavado A, Núñez V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon*. 2009a Dec 1;54(7):1012-28.
58. Lomonte B, Angulo Y, Sasa M, Gutiérrez JM. The phospholipase A<sub>2</sub> homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein and Peptide Letters*. 2009b Aug 1;16(8):860-76.
59. Lomonte B, Gutiérrez JM. Phospholipases A<sub>2</sub> from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov*. 2011 Dec;58(4):647-59.
60. Lomonte B, Rangel J. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A<sub>2</sub> to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*. 2012 Sep 15;60(4):520-30.

61. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951;193:265-75.
62. Mackessy SP, editor. *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC press; 2016 Apr 19.
63. Maraganore JM, Merutka G, Cho WO, Welches W, Kezdy FJ, Heinrikson RL. A new class of phospholipases A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*. 1984 Nov 25;259(22):13839-43.
64. Matsui T, Kamata S, Ishii K, Maruno T, Ghanem N, Uchiyama S, Kato K, Suzuki A, Oda-Ueda N, Ogawa T, Tanaka Y. SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> from snake venom. *Scientific reports*. 2019 Feb 20;9(1):1-8.
65. Ménez A. Molecular immunology of snake toxins. *Pharmacology & therapeutics*. 1985 Jan 1;30(1):91-113.
66. Ministerio de Salud: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. [Internet]. Mapa de Ofidismo por distritos Perú 2017\*. 2017. [Citado 25 de agosto del 2020] Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/SE03/ofidismo.pdf>.
67. Minton Jr SA. The feeding strike of the timber rattlesnake. *Journal of Herpetology*. 1969 Dec 29:121-4.
68. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008 Sep 1;65(18):2897-912.
69. Mora-Obando D, Fernandez J, Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*. 2014 Oct 7;9(10):e109846.
70. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. Seventh Edition. Macmillan; 2013.

71. Nishioka SD, Silveira PV. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1992 Dec 1;47(6):805-10.
72. Núñez CE, Angulo Y, Lomonte B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase  $A_2$  from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon*. 2001 Oct 1;39(10):1587-94.
73. Núñez V, Arce V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase  $A_2$  homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*. 2004 Jul 1;44(1):91-101.
74. Núñez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of proteomics*. 2009 Nov 2;73(1):57-78.
75. O'Driscoll CM. Anatomy and physiology of the lymphatics. Lymphatic transport of drugs. 1992 Apr 22 (pp. 1-35). CRC Press Boca Raton, FL.
76. Oguiura N, Boni-Mitake M, Rádis-Baptista G. New view on crotoamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon*. 2005 Sep 15;46(4):363-70.
77. Otero R, María de fátima DF, Gonçalves LR, Núñez V, García ME, Osorio RG, Romero M, Gutiérrez JM. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. *Toxicon*. 1998 Dec 1;36(12):2021-7.
78. Pantigoso C, Escobar E, Yarlequé A. Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae). *Revista Peruana de Biología*. 2001;8(2):136-48.

79. Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta tropica*. 2005 Jan 1;93(1):85-95.
80. Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. *Venomous animals and their venoms*. 1971;2:345-84.
81. Sandoval GA, Mendoza J, Roldán W, Espinoza Y, Solis H, Yarlequé A. Inmunogenicidad del veneno de *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae) y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos. *Revista peruana de biología*. 2011 Dec;18(3):335-42.
82. Sandoval GA, Espinoza Y, Vivas D, Rodriguez E, Lazo F, Yarlequé A. Inmunogenicidad de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos. *Ágora Revista Científica*. 2015 Jul 20;2(1):73-8.
83. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006 Nov 1;1761(11):1246-59.
84. Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LR, Villalta M, Bonilla C, Herrera M, Vargas M, Fernández M, Yano MY. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 2010 Nov 1;56(6):980-9.
85. Shimohigashi Y, Tani A, Matsumoto H, Nakashima KI, Yamuguchi Y, Oda N, Takano Y, Kamiya HO, Kishino J, Arita H, Ohno M. Lysine-49-phospholipases A<sub>2</sub> from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. *The Journal of Biochemistry*. 1995 Oct 1;118(5):1037-44.
86. Silva WD, Guidolin R, Raw I, Higashi HG, Caricati CP, Morais JF, Lima ML, Yamaguchi IK, Nishikawa AK, Stephano MA, Marcelino JR. Cross-reactivity of

- horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. Memórias do Instituto Butantan. 1989:153-68.
87. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, Freitas-de-Sousa LA, Mourão RH, Chalkidis HM, Valente RH, Moura-da-Silva AM. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. Journal of proteomics. 2017 Apr 21;159:32-46.
  88. Sousa LF, Nicolau CA, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, Mourão RH, Lima-dos-Santos I, Sano-Martins IS, Chalkidis HM, Valente RH. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Sep 12;7(9):e2442.
  89. Statistics IS. SPSS version 21.0 for Microsoft Windows platform. SPSS Inc.: Chicago, IL, USA. 2012.
  90. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1979 Sep 1;76(9):4350-4.
  91. Verheij HM, Boffa MC, Rothen C, Bryckaert MC, Verger R. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A<sub>2</sub>. European journal of biochemistry. 1980 Nov;112(1):25-32.
  92. Vidal JC, Stoppani AO. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. Archives of biochemistry and biophysics. 1971 Aug 1;145(2):543-56.
  93. Ward RJ, Chioato L, De Oliveira AH, Ruller R, Sá JM. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. Biochemical Journal. 2002 Feb 15;362(1):89-96.
  94. Warburg O. Isolierung und kristallisation des gaarungsferments enolase. Biochem. z. 1941; 310:384-421.

95. Warrell DA. Snake bite. The Lancet. 2010 Jan 2;375(9708):77-88.
96. World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: WHO-Offset. 1981; 58.
97. Yamakawa M, Nozaki M, Hokama Z. Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. Animal, plant and microbial toxins. 1976; 1:97-109.
98. Zavaleta Martínez-Vargas A. Mordedura de serpiente (ofidismo): un problema de salud en el Perú. Revista Médica Herediana. 2004 Apr;15(2):61-3.